

UNTERSUCHUNGEN
ZUR PROTEINSTRUKTUR
DER ARCHAEBAKTERIELLEN
PYRUVAT-FERREDOXIN-
OXIDOREDUKTASE
UND ZUR EVOLUTION
SEINES EUKARYONTISCHEN
UND EUBAKTERIELLEN COENZYMS

Johannes Griffig

*Diss
München
1986*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN
ZUR PROTEINSTRUKTUR DER ARCHAEBAKTERIELLEN
PYRUVAT-FERREDOXIN-OXIDOREDUKTASE
UND ZUR EVOLUTION
SEINES EUKARYONTISCHEN UND EUBAKTERIELLEN COENZYMS

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Johannes Griffig
aus Gundelfingen

München, 1986

1.Berichterstatter: Prof.Dr.D. Oesterhelt

2.Berichterstatter: Prof.Dr.E.-L.Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.1986

Meinen Eltern

Herr, lehre doch mich,
daß ein Ende mit mir haben muß,
und mein Leben ein Ziel hat,
und ich davon muß.
Ach wie gar nichts
sind alle Menschen,
die doch so sicher leben.
Sie gehen daher wie Schemen,
und machen ihnen viel vergebliche Unruhe;
sie sammeln und wissen nicht
wer es kriegen wird.

aus: Johannes Brahms (Deutsches Requiem)

DANKSAGUNGEN

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1981 bis November 1985 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dieter Oesterhelt am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Oesterhelt sehr für die Betreuung der Arbeit, die vielen wertvollen Anregungen und die großzügige Unterstützung.

Ich bedanke mich bei

Herrn Dr. Lorenz Kerscher für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und seine Geduld bei der Überwindung von Startschwierigkeiten

Frau Irmtraud Dunger für die Durchführung der Aminosäureanalysen und Ihre Hilfe bei der DNA-Sequenzierung

Herrn Dr. Friedrich Lottspeich für die Sequenzierung der Cysteinpeptide

Herrn Andreas Blanck für seine Hilfe beim Erlernen molekularbiologischer Techniken und die Benutzung seiner Cosmidbank

Frau Dr. Heike Vogelsang-Wencke und Herrn Dr. Helmut Gonschor für hilfreiche Diskussionen

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	5
2.1 Der Pyruvatdehydrogenase Multienzymkomplex	5
2.2 Die 2-Oxosaure-Ferredoxin-Oxidoreduktasen	6
2.3 Aufgabenstellung	11
3. Material und Methoden	13
3.1 Geräte	13
3.2 Chemikalien und Material	14
3.3 Bakterienzucht und Enzymisolierung (15,16)	16
3.4 Allgemeine proteinchemische Methoden	17
3.4.1 Proteinbestimmung	17
3.4.2 Aminosäureanalyse (21)	18
3.4.3 Analytische SDS-PAGE (22,23)	19
3.4.4 Präparative SDS-PAGE (24)	20
3.5 Proteinsequenzierung	21
3.6 Carboxymethylierung (29)	22
3.6.1 des nativen Enzyms	22
3.6.2 des denaturierten Enzyms	23
3.6.3 des denaturierten Enzyms mit 2- ¹⁴ C Iodessigsäure	23
3.7 Isolierung von Cysteinpeptiden (32)	24
3.7.1 S-Carboxymethylierung	24
3.7.2 Kopplung an Thiopropyl-Sephrose 6B	24
3.7.3 Trypsinspaltung und Entkopplung	25
3.7.4 S-Methylierung und HPLC-Trennung	25
3.7.5 Regenerieren der Thiopropyl-Sephrose 6B	26
3.8 Antikörpertest (33)	26
3.8.1 Herstellen von Antikörpern	26
3.8.2 'Western blot' Analyse (34,35)	26
3.9 Oligonucleotidsynthese (36,37)	27
3.10 RNA-Isolierung (39,40)	28
3.11 Reverse Transkription (41)	29
3.11.1 cDNA-Synthese	30
3.11.2 Harnstoff-PAGE	30

3.12	Koloniehybridisierung (42)	31
3.12.1	5'-Markierung	31
3.12.2	Anzucht der Klone	32
3.12.3	Lyse der Kolonien (42)	32
3.12.4	Hybridisieren und Waschen (42)	33
3.13	Cosmidisolierung (43,44)	34
3.14	Restriktionsanalyse (45)	35
3.14.1	Restriktionsspaltung	35
3.14.2	Agarosegel (46)	36
3.14.3	Transfer auf Nitrozellulose ('Southern blot') (47,48)	37
3.14.4	Hybridisierung	37
3.15	DNA-Sequenzierung (49,50,51,52,53)	37
3.15.1	Elektroelution (54)	37
3.15.2	Vektorpräparation	38
3.15.3	Ligation	38
3.15.4	Herstellen kompetenter Zellen	39
3.15.5	Transformation	39
3.15.6	Einzelstrangisolierung	40
3.15.7	Sequenzierung nach Sanger	40
3.15.8	Sequenzierungsgel	41
3.16	'Dot blot' Analyse	43
3.17	Sequenzvergleich (55,56,57)	43
4.	Ergebnisse	46
4.1	Trennung und Immunologie der Untereinheiten	46
4.1.1	Trennung der Untereinheiten	46
4.1.2	Immunologischer Vergleich	52
4.2	Lokalisation des FeS Zentrums	54
4.2.1	Carboxymethylierung	54
4.2.2	Radioaktive Markierung	57
4.3	Isolierung der Cysteinpeptide	58
4.3.1	Kopplung an Thiolsäule	58
4.3.2	HPLC-Trennung und Sequenzierung	60
4.4	Oligonukleotide als 'probe' für das Enzymgen	63
4.4.1	cDNA Synthese	68
4.4.2	Koloniehybridisierung	71
4.5	Oligonukleotide als 'probe' für das Ferredoxingen	72

4.5.1	Koloniehybridisierung			77
4.5.2	Doppelverdau der	Cosmide	und	77
4.5.3	Hybridisierung Einzelverdau der	Cosmide	und	81
	Hybridisierung			
4.6	Das Ferredoxingen			84
4.6.1	Das Strukturgen			84
4.6.2	Die Promotorregion			87
4.6.3	Vergleich mit pflanzlichem Ferredoxingen			88
4.6.4	'Codon usage'			89
4.7	4Fe-4S Ferredoxine bei Archae- und Eubakterien			91
5.	Diskussion			99
5.1	Zur Antigenizität der Oxidoreduktasen			99
5.2	Zum FeS Zentrum des Enzyms			102
5.3	Zur Evolution der 4Fe4S Ferredoxine			103
5.4	Zur Evolution des Enzymsystems			106
6.	Literaturverzeichnis			113
7.	Abkürzungen			122

1. Zusammenfassung

2-Oxosaure-Ferredoxin-Oxidoreduktasen aus Halobakterien unterscheiden sich in Struktur und katalytischem Zyklus fundamental vom 2-Oxosäure Oxidoreduktase Multienzymkomplex aus Bakterien und höheren Organismen.

Die Evolution dieses Enzyms ist aus folgenden Gründen interessant:

1) Strukturelle Verwandtschaft des Enzymsystems aus Halobakterien, die sowohl fakultativ anaerob phototroph, als auch aerob heterotroph wachsen können, mit dem aus obligat fermentativen und photosynthetischen Anaerobiern (*Clostridium* und *Chlorobium*).

2) Große Sequenzhomologie des Coenzyms Ferredoxin (2Fe-2S Zentrum) mit pflanzlichen Ferredoxinen bei völlig anderer Funktion (Elektronenüberträger im letzten Schritt der Photosynthese).

3) Identischer katalytischer Zyklus bei den analogen Enzymen anderer Archaeobakterien (*Thermoplasma*, *Sulfolobus* und *Desulfurococcus*), aber völlig unterschiedliche Struktur ihrer Coenzyme (Ferredoxine mit 4Fe-4S Zentren).

Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

1. Zur Struktur des Enzyms

a) Drei Verfahren zur Trennung der Untereinheiten der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase wurden ausgearbeitet (Erniedrigung der Ionenstärke, Behandlung mit Detergens in hoher Ionenstärke, mehrfaches Einfrieren und Auftauen).

Gegen beide Untereinheiten wurden Antikörper hergestellt. Das Antiserum gegen die kleine Untereinheit zeigte bei der 'Western-blot' Analyse Kreuzreaktion mit der kleinen Untereinheit der gereinigten 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase. Das Antiserum gegen die große Untereinheit zeigte schwache Kreuzreaktion.

b) Das Eisen-Schwefel Zentrum des Enzyms wurde auf der großen Untereinheit lokalisiert. Dazu wurde im Vorversuch die Reaktivität der Cysteine im nativen und denaturierten Zustand bestimmt. Nach Carboxymethylierung des nativen Enzyms und anschließender Modifizierung der Cysteine mit ^{14}C -Jodessigsäure während der Denaturierung mit Harnstoff wurde ausschließlich die große Untereinheit markiert.

c) Die spezifische Reaktivität der Eisen bindenden Cysteine während der Denaturierung wurde ausgenutzt, um solche Peptide, an deren Cysteinen das Eisen-Schwefel Zentrum hängt, zu isolieren. Dabei wurde das Enzym unmittelbar nach Harnstoffzugabe über Disulfidbrücken an eine Thiolssäule gekoppelt, tryptisch gespalten, die Peptide reduktiv eluiert, über HPLC getrennt und sequenziert. Es wurden sechs Cysteinpeptide mit einer Gesamtanzahl von 180 Aminosäuren erhalten. Davon konnte 85% sequenziert werden.

d) Von einem Peptidfragment wurden zwei verschieden lange Oligonukleotide synthetisiert und damit halobakterielle Gesamt-RNA revers transkribiert. Die Länge der resultierenden cDNA unterschied sich genau um die Längendifferenz der entsprechenden Oligonukleotide. Damit wurde die Voraussetzung für die genetische Analyse des Enzyms geschaffen.

2. Zur Evolution des halobakteriellen Ferredoxins

Die Sequenzhomologie des Ferredoxins mit pflanzlichem Ferredoxin wurde auf DNA-Ebene untersucht. Dazu wurde das Gen isoliert: Eine Cosmidbank des halobakteriellen Genoms wurde mit einem 20mer Oligonukleotid aus dem N-terminalen Teil und einem 20mer aus dem C-terminalen Teil des Moleküls geprüft. Beide Oligonukleotide waren 16fach entartet. Aus den Inserts von drei hybridisierenden Kolonien konnten ein PstI-Fragment (400bp) und ein SalI-Fragment (1300bp) isoliert werden, welche mit beiden Oligonukleotiden hybridisierten. Durch Sequenzierung des PstI-Fragmentes und des 5'-Endes des SalI-Fragmentes wurden 372bp des Strukturgens (Gesamtlänge 384bp) und 184bp stromaufwärts des Strukturgens bestimmt. Beim Vergleich des Genabschnitts, der der FeS bindenden Kernregion des Proteins entspricht, mit der entsprechenden Nukleotidsequenz des Ferredoxins aus *Silene pratensis* (weiße Lichtnelke) zeigte sich 47% Homologie. Da beide Ferredoxine unterschiedliche Funktionen erfüllen und völlig verschiedenen Organismen entstammen, läßt sich diese erstaunliche Tatsache sinnvoll nur mit horizontalem Gentransfer von einem Vorläufer der heutigen Chloroplasten, die durch Endosymbiose von Cyanobakterien mit einem Urkaryonten entstanden sind, auf einen Vorläufer der heutigen Halobakterien erklären, wie er auch durch 60%ige Homologie der N-Termini von Gasvakuolenproteinen aus Halobakterien und Cyanobakterien gestützt wird.

3. Zur Evolution der 4Fe-4S Ferredoxine

Es wurde ein Computer-Sequenzvergleich von 3 archaebakte-

riellen und 8 eubakteriellen Ferredoxinen aus unterschiedlichen phylogenetischen Linien mit unterschiedlichen physiologischen Funktionen durchgeführt. Vier von den elf Ferredoxinen sind Elektronenakzeptoren im 2-Oxosaure-Oxidoreduktase System. Es wurde ein Ferredoxin-Stammbaum konstruiert. Der Vergleich von homologen Ferredoxinen mit identischer Funktion aus unterschiedlichen phylogenetischen Linien läßt auf konvergente Evolution oder horizontalen Gentransfer schließen. Ferredoxine aus Organismen derselben Entwicklungslinie (Division), aber mit unterschiedlicher Struktur und Funktion lassen sich als Produkte von divergenter Evolution betrachten.

2. Einleitung

2.1 Der Pyruvatdehydrogenase Multienzymkomplex

Im aeroben Stoffwechsel wird Energie gewonnen durch partielle Oxidation von Kohlenhydraten, Fetten und Aminosäuren zu Substraten des Zitronensäurezyklus und darauffolgende Endoxidation zu CO_2 . Die Redoxäquivalente reduzieren Sauerstoff über die Atmungskette, wo die Hauptmenge an ATP gebildet wird. Das zentrale Substrat des Zitronensäurezyklus ist Acetyl-CoA. Es wird gebildet bei der Oxidation von Fetten und einigen Aminosäuren sowie durch oxidative Decarboxylierung von Pyruvat. Diese zentrale Stoffwechselreaktion wird katalysiert durch den Pyruvatdehydrogenase Multienzymkomplex (1), das größte aller bekannten Enzyme überhaupt und in seiner Komplexität vielleicht nur von der Fettsäuresynthetase übertroffen - vielleicht die Folge seiner zentralen Stellung im Stoffwechsel. Der Komplex besteht aus drei Arten von Teilenzymen mit unterschiedlicher, aber definierter Kopienzahl. Das erste Teilenzym, die Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1), enthält Thiamindiphosphat als prosthetische Gruppe und katalysiert die Oxidation des Pyruvats nach Umpolung durch Bindung an Thiamindiphosphat (aktivierter Aldehyd) und Reduktion der Liponsäure (Thioester). Das zweite Teilenzym, die Dihydrolipoyltransacetylase (EC

2.3.1.12). katalysiert die Übertragung des Acetylrestes von der Dihydroliponsäure auf CoA. Das dritte Teilenzym, die Dihydrolipoyldehydrogenase (EC 1.6.4.3), enthält FAD als prosthetische Gruppe und katalysiert die Reoxidation der Dihydroliponsäure zur Disulfidform unter Reduktion von NAD^+ . Diesem Enzymkomplex der Mitochondrien und Eubakterien stehen die 2-Oxosäure-Ferredoxin-Oxidoreduktasen gegenüber, die eine vollkommen andere Architektur und katalytischen Mechanismus besitzen und bei einigen Eubakterien sowie bei Archaeobakterien vorkommen.

2.2 Die 2-Oxosäure-Ferredoxin-Oxidoreduktasen

Sie wurden zunächst in fermentativen (*Clostridium acidi-urici*) (2.3) und photosynthetischen (*Chlorobium thiosulfatophilum*) (4) Anaerobiern und in Cyanobakterien (*Anabaena variabilis* und *Anabaena cylindrica*) (5.6) entdeckt.

Die als Elektronenakzeptoren beteiligten Ferredoxine bei Anaerobiern (4Fe-4S Zentren) unterscheiden sich jedoch in ihrer Struktur grundsätzlich von den bei Cyanobakterien (2Fe-2S Zentren). Diese Trennung bezüglich der Coenzymstruktur zieht sich auch durch das Reich der Archaeobakterien. *Halobacterium halobium* besitzt ein Ferredoxin vom 2Fe-2S Typ (7), während die drei Organismen des thermoacidophilen Zweiges (*Thermoplasma*, *Sulfolobus* und *Desulfurococcus*) Ferredoxine vom 'Bakterientypus' (4Fe-4S) besitzen (8). Bei Methanogenen ist der Enzymtyp bislang nicht nachgewiesen.

Die Funktion des (3Fe-3S) Ferredoxins (*Methanosarcina*), das auch zum 'Bakterientypus' zählt, ist nicht eindeutig geklärt.

Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase wurde bisher nur bei Halobakterien genauer untersucht (9,10). Vom Enzym aus *Clostridium acidi-urici* waren vor der Analyse des halobakteriellen Enzyms folgende Daten bekannt (2,3):

a) Molekulargewicht 240000Da b) Gehalt an anorganischem Schwefel, Eisengehalt und Spektraleigenschaften deuten auf 2(4Fe-4S) Cluster hin c) Thiamindiphosphat als prosthetische Gruppe d) weder Liponsäure noch FAD als Coenzyme e) keine NAD^+ Reduktion.

Hohe Sauerstoffempfindlichkeit erschwerte die weitere Charakterisierung des Enzyms im anaeroben Organismus.

Alle diese Daten bestätigten sich beim halobakteriellen Enzym.

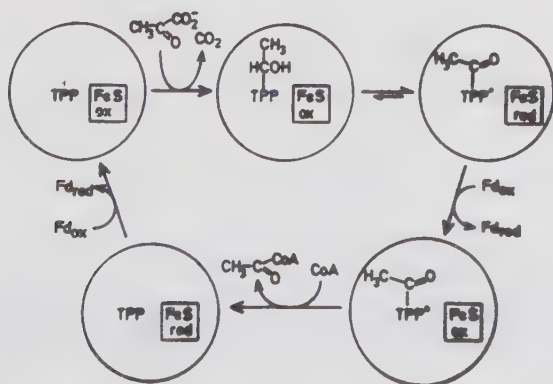


Abb.1. Der katalytische Zyklus der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Halobacterium halobium*

Das Enzym aus *Halobacterium halobium* ist sauerstoffstabil, benötigt aber wie die meisten halobakteriellen löslichen Proteine (11) infolge der hohen intrazellulären Salzkonzentration für Stabilität und Aktivität hohe Ionenstärken. Zum katalytischen Mechanismus (Abb.1) wurden detaillierte Untersuchungen durchgeführt (10). Die Bindung der 2-Oxosäure an Thiamindiphosphat unter Bildung von Hydroxyethylthiamindiphosphat geschieht analog der Reaktion am Multienzymkomplex. Die beiden (4Fe-4S) Zentren befinden sich im höchsten Oxidationszustand (+2), in dem die äußeren Elektronen spingepaart sind. Die Cluster sind nach außen hin diamagnetisch und ergeben kein ESR-Signal.

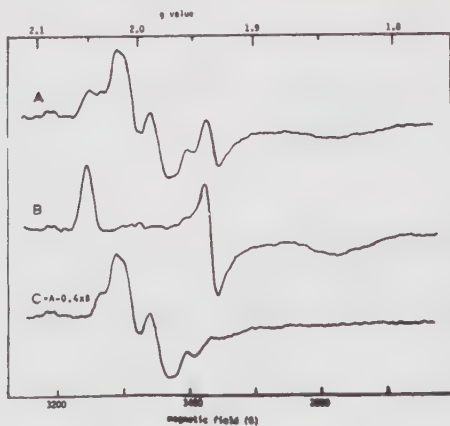


Abb.2. ESR-Spektren (bei 12K) der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase nach Reduktion mit 0,5mM Pyruvat und 0,05mM CoenzymA (A) bzw. Reduktion mit Dithionit (B). C zeigt das Differenzspektrum der Kopplung aus Thiamindiphosphatradikal mit dem FeS Zentrum (A) und dem Dithionit-reduzierten FeS Zentrum (0,4xB)

Bei Zugabe der 2-Oxosäure wird eines dieser Eisen-Schwefel Zentren auf die Redoxstufe +1 reduziert. Durch das

zusätzliche ungepaarte Elektron wird ein Cluster paramagnetisch und es wurde bei einfacher Reduktion das für (4Fe-4S) Zentren bei 12K typische rhombische d.h. im Bezug auf alle drei Raumrichtungen anisotrope ESR-Signal (Abb.2B) entstehen (zwischen beiden Eisen-Schwefel Zentren findet infolge des zu großen Abstandes zueinander keine Kopplung statt). Diesem Signal ist jedoch ein weiteres anisotropes Signal überlagert (Abb.2A und 2C). Beide koppeln miteinander d.h. die Radikalzentren haben einen maximalen Abstand von 10-12Å. Aus diesem spektroskopischen Befund wurde geschlossen, daß Hydroxyethylthiamindiphosphat durch Abgabe eines Elektrons auf eines der beiden FeS Zentren ((4Fe-4S) Cluster sind Ein-Elektronen-Überträger) ein Radikal bildet.

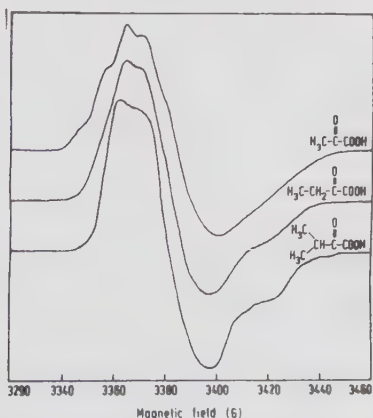


Abb.3. ESR-Signal (bei 300K) des freien Radikalintermediats der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase bei Substitution der Protonen am C-3 durch Methylgruppen

Die Tatsache, daß Pyruvat an der Radikalstruktur beteiligt ist (Abb.3), wurde durch Pyruvatanaloga bestätigt (12). Die Stabilität des Radikals wird erreicht durch Delokalisation

des ungepaarten Elektrons über die Carbonylgruppe des Acylrestes und die aromatische Thiazolstruktur (Abb.4). Es ist anzunehmen, daß die Polypeptidkette des Enzyms das Radikal abschirmt. Das Eisen-Schwefel Zentrum wird durch Ferredoxin reoxidiert. Bei Zugabe von CoA wird das zweite Elektron auf das FeS Zentrum übertragen, wobei das radikalische Intermediat unter Acetylierung des CoASH zerfällt. Die Reoxidation des FeS Clusters durch Ferredoxin beendet den Zyklus.

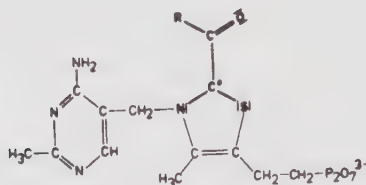


Abb.4. Strukturvorschlag für das freie Radikalintermediat (entstanden durch Abgabe eines Elektrons nach Bildung von Hydroxyalkyl-Thiamindiphosphat)

Aus diesen Daten ergaben sich folgende fundamentale Unterschiede beim chemischen Mechanismus der oxidativen Decarboxylierung im 2-Oxosäuredehydrogenase Multienzymkomplex (a) einerseits und der 2-Oxosäure-Ferredoxin-Oxidoreduktase (b) andererseits:

1. Elektronenübertragungskette:

a. 2-Oxosäure/Liponsäure/FAD/NAD

b. 2-Oxosaure/FeS/Ferredoxin

2a. 3 Teilenzyme und drei getrennte Reaktionen

2b. ein aktives Katalysezentrum

3a. ein Oxidationsschritt mit 2-Elektronenübergang

3b. zwei Oxidationsschritte mit 1-Elektronenübergängen

2.3 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, Aussagen über die Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms zu treffen. Eine zentrale Rolle bei der Oxidation der 2-Oxosäure spielt das Eisen-Schwefel Zentrum, welches die Elektronen von der 2-Oxosäure übernimmt und an Ferredoxin weitergibt. Deshalb sollten Versuche zur Struktur dieses FeS Zentrums unternommen werden. Es sollte durch Sequenzinformation die Voraussetzung für die Untersuchung der Genstruktur geschaffen werden. Die Expression des Gens nach Klonierung mit Hilfe eines Expressionsvektors im heterologen System (Versuche der Transformation von genetischem Material im homologen System sind bisher gescheitert) erscheint auf Grund der speziellen Erfordernisse halobakterieller Gene auf genetischer (archaeobakterielle Signalsequenzen sind kaum bekannt) und Proteinebene (hohe Ionenstärke erforderlich) momentan noch wenig aussichtsreich.

Es sollte die Verwandtschaft zwischen der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und der 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase näher untersucht werden (immunologischer Vergleich).

Die Ferredoxine unterscheiden sich im selben Enzymsystem

innerhalb der Archaeobakterien überraschenderweise fundamental. Die Sequenzanalyse der Ferredoxine aus *Thermoplasma acidophilum* und *Sulfolobus acidocaldarius* wurde im Verlaufe der vorliegenden Arbeit fertiggestellt (13,14). Die phylogenetische Stellung dieser Ferredoxine im Vergleich mit eubakteriellen 'Bakterientyp' Ferredoxinen sollte durch Computersequenzvergleich untersucht werden.

Schließlich sollte der Frage nachgegangen werden, warum Halobakterien ein 2Fe-2S Ferredoxin vom 'Pflanzentyp' besitzen - die Ferredoxine in Halobakterien und in den Chloroplasten haben völlig unterschiedliche Funktion. Durch genetische Analyse des halobakteriellen Ferredoxins und Vergleich mit pflanzlichen Ferredoxingenen sollte die Hypothese eines horizontalen Gentransfers zwischen Cyanobakterien (den Vorläufern der Chloroplasten) und Halobakterien, wie er auch durch große Homologien von Teilsequenzen von Gasvakuolenproteinen gestützt wird, untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Gynkotheek constant flow pump Modell 600/200

Gynkotheek gradient former modell 2500

Reversed phase column RP18 (Merck Lichrosorb 10um)

Photometer Knauer variable wavelength monitor

Photometer Kontron Uvikon 725

Photometer Shimadzu SPD-2A

Schreiber Servogor 220/320/330 BBC Goerz

Fraktionssammler LKB Multirak 2111

Photometer LKB Uvicord S2138

Schreiber LKE 2-channel recorder 2210

Scintillationszähler MR300 Kontron

Spektralphotometer PM6 Zeiss

Spektralphotometer Kontron Uvikon 810

Spektralphotometer Varian Cary 210

Aminosäureanalysator Kontron Liquamat III Labotron

Melag Sterilisierautoklav Typ 26

Sterico Vapoklav 500D

Fermentor Drive Assembly New Brunswick Scientific Co.

Lab shaker A.Kuhner AG Basel

Eppendorf Thermostat 5320

Speed Vac Concentrator Bachhofer Reutlingen

Eppendorf Centrifuge 5414 und 5414S

Kontron Zentrifuge Hermle ZK 400

Kontron Ultrazentrifuge TGA-50 und TGA-65

Großzentrifuge Wilhelm Stock Marburg

Präparative Disk Elektrophorese 7900 Uniphor column
electrophoresis system LKB

Lyophilisator Christ BETA I

Monacor Doppellabornetzgerät PS-605

Elektrophoresis constant power supply ESCP 3000/150

Pharmacia

Applied Biosystems 380A DNA-Synthesizer

Amicon Ultrafiltrationszellen Model 175 PSI 402Max und 202Max

Amicon Mikroultrafiltrationssystem 8MC

Gelapparaturen für Vertikal- und Flachbettgele und
Westernblot Apparatur sind Eigenbau des Instituts

3.2 Chemikalien und Material

Alle nicht aufgeführten Chemikalien (zur Analyse) wurden von
Merck, Sigma, Serva oder Fluka bezogen

X-ray 90 Film	Linhardt, München
Verstärkerfolien	Du Pont, Wilmington
3 MM Chromatographiepapier	Whatman, Großbritannien
Diaflo Membranen PM 30	
YM 30	
PM 10	Amicon, Niederlande
Nitrocellulose 45µm,	
DE 81 Papier,	

Celluloseacetat CA-250/0	Schleicher & Schull, Dassel
Celluloseacetatfilter	
HAWP 01300	Millipore, Molsheim
Agarose	Seakem, Marine colloids Div. FMC Corp, Rockland, USA
Agar,	
Bactotrypton,	
Yeast Extract	Difco, Detroit, USA
Caesiumchloride	Biomol, Ilvesheim
Paraffin	Caesar und Loretz, Hilden
Radiochemikalien	Amersham-Buchler, Braunschweig NEN, Dreieich
Sepharose 4B,	
Sephadex G25,	
Thiopropyl-Sepharose 6B	Pharmacia, Uppsala, Schweden
HA Ultrogel,	
Ultrogel AcA 34, AcA 44	LKB, Bromma, Schweden
FITC Anti-Rabbit Antiserum,	
Proteinase K,	
DNA Längenstandard III	Boehringer, Tutzing
Trypsin (CPTK-treated)	Worthington, USA
Polynukleotidkinase,	
Klenow large fragment,	
M13mp8,	
pBR 322	PL Biochemicals, St. Goar
17er primer (M13)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
AMV Reverse Transkriptase	J. Beard, Life Science
BAP,	

T4 Kinase,

T4 DNA Ligase

Restriktionsenzyme

BRL, Neu-Isenburg

Boehringer, Tutzing

PL Biochemicals, St. Goar

BRL, Neu-Isenburg

Biolabs, Schwalbach

Freundsches Adjuvans

Behringwerke AG, Marburg

E.coli HB 101

Heike Vogelsang, Martinsried

BMH 71.18

Heike Vogelsang, Martinsried

Cosmid library (Hal.halob.) Andreas Blanck, Martinsried

3.3 Bakterienzucht und Enzymisolierung (15,16)

Die Halobakterien (Wildtyp R1) wurden unter Standardbedingungen gezüchtet (15). Die Enzymanreicherung wurde im wesentlichen durchgeführt wie in (16) beschrieben. Der Ansatz wurde jedoch von 10l (16) auf 30l vergrößert. Die Volumina bei Zellaufschluß (-70°C) und Ammoniumsulfatfällung wurden verdreifacht. Die Säulenbedingungen änderten sich wie folgt:

Sepharose4B, 6x20cm, Auftragsvolumen 2100ml, Flußrate 200ml/h

Elutionsvolumen 4000ml, Flußrate 200ml/h

ACA 34, 5x90cm, Elutionsdauer ca. 40h, Flußrate 20ml/h

HA-Ultrogel, 3x10cm, Elutionsvolumen 300ml, Flußrate 20ml/h

Die Gelfiltration (ACA 34) wurde ohne Recycling durchgeführt. Statt reinen Hydroxylapatits von Sigma wurde

HA-Ultrogel von LKB verwendet. Reines Hydroxylapatit ist sehr feinkörnig und führt leicht zum Verstopfen der Säule. Während HA-Ultrogel höhere Flußraten erlaubt. Die Trenneigenschaften waren jedoch nicht vergleichbar gut. Der Gradient wurde geändert auf 50mM Phosphat/3M KCl-150mM Phosphat/3M KCl (Elutionsbereich bei 130mM Phosphat).

3.4 Allgemeine proteinchemische Methoden

3.4.1 Proteinbestimmung

a) Amidoschwarzmethode (17,18)

Färbelösung: 0.5% Amidoschwarz

45 % Methanol

10 % Eisessig

Entfärber: 90 % Methanol

2 % Eisessig

Auflöser: 10 % TCA

80 % Eisessig

5 % Ameisensäure

Die Probe wird auf Celluloseacetat getupfelt, 5min gefärbt, 3x10min entfärbt. in der Kuvette mit Auflöser gelöst und bei 630nm gemessen. Für die Eichkurve wurde BSA verwendet (2-100ug).

b) Methode nach Lowry (19,20)

Lösung A (pro l): 18.0g Na_2CO_3

3,6g NaOH

1,6g K-Na-Tartrat

9,0g SDS

Lösung B (pro 100ml): 3,6g CuSO_4

Lösung C: B/A 1:100 (frisch angesetzt)

Zu 200ul Probevolumen wird 1ml Lösung C gegeben. Nach 15min werden unter starkem Rühren 100ul einer frischen Mischung von Folin-Ciocalteu -Reagens/ H_2O 1:1 zugesetzt und nach 30min bei 750nm gemessen. Für die Eichkurve wurde BSA verwendet (2-20ug).

3.4.2 Aminosäureanalyse (21)

Probenpuffer: 0,2M Citrat pH2,2

2 % Thioglykolsäure

0,1% Phenol

Salzfreies, lyophilisiertes Protein wurde nach 1. bzw. 2. weiterverarbeitet:

1. Nach Zugabe von 0,5ml über SnCl_2 destillierte 6N HCl und 10ul 5% Phenol zum Schutz der Tyrosine wurde die Probe im evakuierten, zugeschmolzenen Analysenröhrchen 24h bei 110°C hydrolysiert. Die Säure wurde im Exsikkator über KOH entfernt und die Probe in 300 ul Probenpuffer aufgenommen.

2. Reine Ameisensäure und 30% H_2O_2 wurden im Verhältnis 9:1 gemischt und 2h bei RT vorinkubiert. Nach Zugabe von 200ul der entstandenen Perameisensäure wurde die Probe 24h bei 0°C oxidiert, lyophilisiert, wie oben hydrolysiert, getrocknet und in Probenpuffer aufgenommen.

3.4.3 Analytische SDS-PAGE (22,23)

Es wurden Plattengele (12x12x0,15cm) mit linearem Acrylamidgradienten verwendet.

	Trenngel		Obergel
	5%	25%	3,3%
1M Tris-HCl pH8.8	4,7ml	4,7ml	-
1M Tris-HCl pH6.8	-	-	1.4ml
H ₂ O	5,7ml	1,0ml	9,0ml
50%Acrylamid/1.2%Bis	1,2ml	6,0ml	0.8ml
10% SDS	0,1ml	0,1ml	0,1ml
TEMED	0.2ml	0,1ml	0.1ml
1,5% Persulfat	0,1ml	0,1ml	0,4ml
	12,0ml	12,0ml	11.8ml

Probenpuffer: 100mM Tris-HCl pH6.8
 1% SDS
 1% Mercaptoethanol
 0.005% Bromphenolblau
 20% Sucrose

Elektrodenpuffer: 25mM Tris-HCl pH8.3
 192mM Glycin
 0.1% SDS

Färbelösung: 0,2% Coomassie Blue G-250
 20% Methanol
 5% Eisessig

Entfarber: 20% Methanol
 5% Eisessig

Die Proben wurden in 10-50ul Probenpuffer gelöst und 2min auf 95°C erhitzt. Die Gele liefen über Nacht bei 80V, bis der Marker das Ende des Gels erreicht hatte. Es wurde 5min in 10% TCA fixiert, 1h gefärbt und über Nacht entfärbt.

3.4.4 Preparative SDS-PAGE (24)

alle Lösungen pro 100ml

Lsg A: 36,6g Tris + 5,45ml 32% HCl

Lsg B: 25,6ml 1M H_3PO_4 + 5,7g Tris

Lsg C: 48g Acrylamid + 1,4g Bis

Lsg D: 10g Acrylamid + 2,5g Bis

Lsg F: 50% Saccharose

Lsg P: 1,4% Persulfat

Lsg S: 0,8g SDS + 0,46ml TEMED

Lsg K: 3% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

Lsg S': 0,8g SDS + 0,08ml TEMED

Untergel (6%): 8,8 ml A

8,8 ml C

31,6 ml H_2O

8,8 ml S

0,12ml K

3,4 ml P

Das Untergel wurde mit 1ml A, 1ml S und 6ml H_2O

überschichtet und 3h polymerisiert.

Obergel (2,7%): 1 ml B
 1 ml D
 3 ml F
 1 ml S'
 0.5 ml P

Das Obergel wurde mit 10ml B, 10ml S' und 60ml H₂O

überschichtet und über Nacht polymerisiert.

Elektrodenpuffer (-) (pro l): 63,5g Tris pH8,9
 39,5g Glycin
 10 g SDS

Elektrodenpuffer (+) (pro l): 121 g Tris pH8,1
 56,8g 32% HCl
 10 g SDS

Laufbedingungen: 90min 100V 4-6mA
 3h 140V 6mA
 12h 300V 10mA
 8h 400V 12mA

3.5 Proteinsequenzierung

Die Peptide wurden durch Edman Abbau in einem Prototyp Sequenator nach der 'spinning cup' Version sequenziert (25).

Er ist optimiert auf Peptidsequenzierung: Verwendung von 0,1M Quadrolpuffer, reduzierte Extraktionszeiten, eine einzige Abspaltung. Die Peptide wurden in Gegenwart von 1mg Polybren (EGA Chemie, Steinheim) sequenziert (26). Bei Prolin im Zyklus wurde die Reaktionszeit auf 15min verlängert (27). Die PTH-Derivate wurden identifiziert mit isokratischem HPLC-Lauf (28).

3.6 Carboxymethylierung (29)

Puffer A: 0,5M Tris-HCl pH8,6

3 M KCl

Puffer B: 50mM Tris-HCl pH8,0

1mM EDTA

3.6.1 des nativen Enzyms

50ul Enzymlösung (1,5nmol) (8mg/ml)

200ul Puffer A

30ul 0,1M EDTA in Puffer A

10ul 0,1M DTT in Puffer A

10ul 1 M Jodessigsäure in 3M Tris-HCl pH8,6

Dieser Ansatz wurde 30min im Dunkeln bei RT inkubiert, bei 40°C auf eine Sephadex G25 Säule (1x80cm), die mit 1mM Tris-HCl pH8,6 äquilibriert worden war, aufgetragen (Flußrate 20ml/h) und mit demselben Puffer eluiert. Die Enzymfraktionen (1.Peak bei 280nm) wurden vereinigt, in 2 gleiche Teile aufgeteilt und lyophilisiert. Von beiden Teilen wurde die Aminosäurezusammensetzung bestimmt, wobei

der zweite Teil vorher mit Perameisensäure oxidiert worden war.

3.6.2 des denaturierten Enzyms

50ul Enzymlosung (1,5nmol) (8mg/ml)

160ul 10 M Harnstoff

40ul 2,5M Tris-HCl pH8,6

30ul 0.1M EDTA in Puffer A

10ul 0.1M DTT in Puffer A

Dieser Ansatz wurde 5h bei 37°C inkubiert. 10ul 1M Jodessigsäure in 3M Tris-HCl pH8,6 zugegeben. 30min im Dunkeln bei RT inkubiert und wie unter 3.6.1 weiterbehandelt.

3.6.3 des denaturierten Enzyms mit 2-¹⁴C Iodessigsäure

Der Ansatz wurde wie unter 6.1 dunkelinkubiert und auf 50ul eingengt (8MC Amiconzelle, PM30 Membran). Das Eisen-Schwefel Zentrum wurde auf zwei alternative Arten zerstört:

a) +5ul 2 M Tris-HCl pH8,8

+2ul 5mM 2-¹⁴C Jodessigsäure (50uCi/umol)

+40ul 10M Harnstoff

Es wurde 20min im Dunkeln bei RT inkubiert.

b) +5ul 2 M Tris-HCl pH8,8

+2ul 5mM 2-¹⁴C Jodessigsäure (50uCi/umol)

+10ul 1% o-Phenanthrolin (30)

Es wurde 2h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Danach wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Das Gel wurde

fixiert, gefärbt, entfärbt. 2x30min mit DMSO (31) und 2h mit 20% PPO in DMSO behandelt. über Nacht gewässert, unter Vakuum getrocknet und 24h autoradiographiert.

3.7 Isolierung von Cysteinpeptiden (32)

Puffer A und Puffer B siehe unter 3.6.

3.7.1 S-Carboxymethylierung

200ul Enzymlösung (12nmol, 15mg/ml)

240ul Puffer A

36ul 0.1M EDTA in Puffer A

12ul 0.1M DTT in Puffer A

12ul 1 M Jodessigsäure in 3M Tris-HCl pH8.6

Der Ansatz wurde wie unter 3.6.1 behandelt, jedoch in 3M KCl/50mM Tris-HCl pH8.0 eluiert und auf 0.5ml eingengt (Amicon 8HC).

3.7.2 Kopplung an Thiopropyl-Sepharose 6B

Zur Mischung aus (3.7.1) wurden 0.5ml 8M Harnstoff/1mM EDTA/50mM Tris-HCl pH8.0 gegeben. Dieser Ansatz wurde sofort bei 4°C mit der Flußrate 20ml/h auf eine Thiolsepharosesäule (0,5x6cm), die mit entgastem Puffer (1M KCl/4M Harnstoff/1mM EDTA/50mM Tris-HCl pH8.0) äquilibriert war, aufgegeben und mit entgastem Puffer über Nacht bei 4°C mit einer Flußrate von 0,2ml/h eluiert. Anschließend wurde mit Puffer B gewaschen.

3.7.3 Trypsinspaltung und Entkopplung

Das Säulenmaterial von 3.7.2 wurde in einem 100ml Erlenmeyerkolben mit 12µg Trypsin (2units) in 5ml Puffer B versetzt. 4h bei RT inkubiert und die Thiolsepharose zurück in die Säule gefüllt. Dann wurde mit Puffer B, danach mit 1M NaCl/1mM EDTA/0.1M Na-Acetat pH4,0 und schließlich wieder mit Puffer B gewaschen. Die Peptide wurden anschließend mit 10mM DTT/Puffer B eluiert und das gesamte Eluat lyophilisiert.

3.7.4 S-Methylierung und HPLC-Trennung

Laufmittel A: 0.17% TFA in Wasser

Laufmittel B: 0,05% TFA in Acetonitril

Zum Lyophilisat von 3.7.3 wurden 0.5ml H₂O und 80ul Methyljodid gegeben. 20min bei RT kräftig geschüttelt. 100ul Ameisensäure zugesetzt und die Mischung in eine 'reversed-phase' Säule RP18 eingespritzt. Mit folgendem Gradienten wurde eluiert (Flußrate 1.2ml/min):

Zeit(min)	%Laufmittel A
40	100
160	100-60
10	60-40
10	40-0
10	0
10	0-100
10	100

Die Peptide wurden bei 220nm und 280nm detektiert, mit einem

Zweikanalschreiber registriert. die absorbierenden Fraktionen (1.2ml) vereinigt und lyophilisiert.

3.7.5 Regenerieren der Thiopropyl-Sepharose 6B

Die Säule wurde mit H_2O und 0.1M Boratpuffer pH8 gewaschen. das Säulenmaterial in einen 100ml Erlenmeyerkolben überführt. in einer Mischung von 10ml Boratpuffer und 220mg 2,2'Dithiopyridyldisulfit in 5ml Ethanol 6h im 70°C Wasserbad geschüttelt. zurück in die Säule gefüllt. über Nacht mit 50% Ethanol und darauf mit Wasser und Puffer gespült.

3.8 Antikorpertest (33)

3.8.1 Herstellen von Antikörpern

Vor der Immunisierung der Kaninchen wurde 5ml Kontrollserum entnommen. Je 100ul Antigen (80ug der kleinen und 30ug der großen Untereinheit) wurden mit 100ul Freund'schem kompletten Adjuvans gemischt und die weiße Emulsion subkutan injiziert. Es wurde nach 10 Tagen und noch zweimal nach je 7 Tagen dieselbe Antigenmenge mit Freund'schem inkompletten Adjuvans 'geboostert' und nach weiteren 7 Tagen durch Anritzen einer Ohrvene Blut entnommen. Nach Zentrifugation wurde das Serum bei -70°C aufbewahrt. aufbewahrt.

3.8.2 'Western blot' Analyse (34,35)

BSA-Puffer: 3% BSA

150mM NaCl

10mM Tris-HCl pH7,3

'Salzpuffer': 150mM NaCl

10mM Tris-HCl pH7.3

Blotpuffer: 20% Methanol

192mM Glycin

25mM Tris

Nach SDS-PAGE wurde das Protein in einer 'Western blot' Apparatur in Blotpuffer auf Nitrocellulose transferiert (30V, 200-300mA, 3h). Der Transfer wurde durch Coomassieanfärbung des Gels überprüft. Die Nitrocellulose wurde 30min bei 37°C mit 100ml BSA-Puffer abgesättigt. Dazu wurden 200ul Antiserum (Verdünnung 1:500) zupipettiert und 60min bei 37°C inkubiert. Dann wurde 3x10min mit 'Salzpuffer' gewaschen. 30min bei 37°C mit 100ml BSA-Puffer + 20ul Anti-rabbit IgG FITC-konjugiertem Antiserum (Sigma) aus der Ziege inkubiert (Verdünnung 1:5000) und mit Salzpuffer gewaschen. Fluoreszenz wurde durch Anregung bei 254nm beobachtet.

3.9 Oligonucleotidsynthese (36,37)

Oligonucleotide wurden mit einem vollautomatischen DNA-Synthesizer (Applied Biosystems) an der Festphase nach der Phosphoramidit-Methode in 3'-5'Richtung synthetisiert. Die Ausgangsprodukte (Diisopropylphosphoramidite) sind im Festzustand sehr stabil und nicht hygroskopisch. Die Kopplungsausbeuten liegen in der Größenordnung von 98%. Ein Zyklus dauert 15-20min bei sehr sparsamem Reagentienverbrauch (nur 10facher Monomerüberschuß. Schläuche ohne

Totvolumen). Die Beförderung von Lösungen geschieht nicht durch mechanische Pumpen sondern durch Gasdruck (Argon). Das Rohprodukt (Oligonucleotidgemisch) wird nach dem letzten Zyklus von der Säule abgetrennt, von Schutzgruppen befreit und mit HPLC über eine reversed phase Säule gereinigt. Gemischte Oligonucleotide werden hergestellt durch Mischen der entsprechenden Phosphoramidite vor Aktivierung und Kopplung.

3.10 RNA-Isolierung (39.40)

Guanidin-SCN Puffer: 4M Guanidiniumrhodanid
 25mM Na-Citrat pH 7.0
 0,5% Laurylsarcosin
 0,3% Antifoam A
 0,7% Mercaptoethanol

Guanidin-HCl Puffer: 7,5M Guanidiniumhydrochlorid
 25mM Na-Acetat pH 7,0
 5mM DTT

3l Zellen von *Halobacterium halobium* wurden in der mittleren logarithmischen Phase ($OD_{660}=1.0$) geerntet und in 250ml Guanidin-SCN Puffer homogenisiert. Je 25ml Homogenisat wurden in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen auf 8ml 5,7M CsCl/25mM Na-Acetat pH 5,0 geschichtet und 20h bei 20°C mit 35000rpm zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde jeweils in 3ml Guanidin-HCl Puffer aufgenommen. Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 5,0 gebracht. Daraufhin wurde die RNA mit demselben Volumen Ethanol gefällt, mit Ethanol gewaschen und

in sterilem Wasser aufgenommen. Es wurde noch zweimal in 0,1M Na-Acetat pH5.0 durch Zugabe von 2 Volumenanteilen EtOH gefällt und in sterilem Wasser aufgenommen.

3.11 Reverse Transkription (41)

T_H =theoretische Hybridisierungstemperatur

(A/T:2°C, G/C:4°C, A/T oder G/C:3°C)

Puffer 1: 20mM NaHPO₄ pH6,7
 20mM EDTA
 200mM KCl

Puffer 2: 500mM Tris-HCl pH8,9
 400mM KCl
 50mM MgCl₂
 10mM DTT

dNTP_C: 5 mM ATP
 5 mM GTP
 5 mM TTP
 0.3mM CTP

Probenpuffer: 80 % Formamid
 1mM EDTA
 10mM NaOH
 0.3% Orange G
 0.3% Bromphenolblau
 0.3% Xylencyanol FF

3.11.1 cDNA-Synthese

1-5µg RNA + 50pMol Oligonucleotid wurden getrocknet (speed vac). 5µl Wasser und 7µl Puffer 1 zugesetzt, auf 75°C erhitzt und auf $T_H + 5^\circ\text{C}$ abgekühlt. Dann wurde nach folgendem Temperaturprogramm hybridisiert:

min	Temp.
60	$T_H + 5^\circ\text{C}$
60	T_H
60	$T_H - 5^\circ\text{C}$
60	$T_H - 10^\circ\text{C}$

Es wurde auf RT abgekühlt und 8,8µl Puffer 2, 4,4µl dNTP_C und 1,6µl Wasser zugegeben. Dieser Ansatz wurde 100uCi trockenem (α -³²P)dCTP (3uCi/pMol) zugefügt, 0,6µl AMV Reverse Transkriptase (50units/ul) addiert und 15min bei RT, 15min bei 25°C und 2h bei 30°C polymerisiert. Nach Zugabe von 20ul 50mM EDTA wurde mit Phenol extrahiert, mit 0,3M Na-Acetat/3Vol Ethanol gefällt, mit 70% und 100% EtOH gewaschen und getrocknet. Nach Zufügen von 15ul 0,1M NaOH + 1ul 50mM EDTA wurde die RNA 1h bei 30°C hydrolysiert, 10ul Probenpuffer zugegeben, elektrophoretisiert und autoradiographiert.

3.11.2 Harnstoff-PAGE

TBE-Puffer: 90mM Tris pH8,3

90mM Borsäure

3mM EDTA

Das Gel (20x40x0,1cm) wurde in TBE-Puffer hergestellt:

6% Acrylamid

0,2% Bis

7M Harnstoff

0,05% TEMED

0,05% Persulfat

Elektrodenpuffer: TBE

Laufbedingungen: 900V, 30W, 35mA, 4h

Längenmarker: HpaII Spaltung von pBR322

3.12 Koloniehybridisierung (42)

3.12.1 5'-Markierung

PNK-Puffer: 0,5 M Tris-HCl pH7,6

0,1 M $MgCl_2$

50mM DTT

1mM Spermidin

1mM EDTA

30pMol Oligonucleotid + 30pMol (γ - ^{32}P) dATP (3uCi/pMol) wurden in der 'speed vac'-Zentrifuge eingedampft. 10ul PNK-Puffer, 40ul H_2O und 2ul T4 Polynukleotidkinase (10units/ul) zugesetzt und 90min bei 37°C phosphoryliert. Der Erfolg der Endmarkierung wurde überprüft durch Adsorption an DE81 Papier: je 0,5ul wurden vor und nach der Reaktion auf DE81 Papier gestupfelt. nach dem Trocknen 5x5min mit 0,5M Na_2HPO_4 , 2x1min mit Wasser und 1min mit Ethanol gewaschen. Die gebundene Radioaktivität wurde nach

dem Trocknen im Scintillationszähler bestimmt.

3.12.2 Anzucht der Klone

LB Agarplatten (pro 1): 15g Agar

10g Bactotrypton

10g NaCl

5g Yeast Extract

5mg Thiamin

LB Agarplatten (Amp100): +100mg Ampicillin

(nach Autoklavieren)

Die Klone wurden aus der Genbank direkt auf LB Agarplatten (Amp100) überstempelt, über Nacht bei 37°C inkubiert und bei 4°C aufbewahrt. Diese Kolonien wurden auf sterile Nitrocellulosefilter überstempelt, die auf LB Agarplatten (Amp100) aufgelegt waren, und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.12.3 Lyse der Kolonien (42)

Die Nitrocellulosefilter wurden nacheinander in folgenden Lösungen auf 3MM Whatman Papier getränkt und zwischendurch immer 10min luftgetrocknet:

10min 0.5M NaOH

10min 0,5M NaOH

10min 1M Tris-HCl pH8

10min 1M Tris-HCl pH8/1,5M NaCl

1h Chloroform

Anschließend wurden die Filter 2h bei 80°C gebacken.

3.12.4 Hybridisieren und Waschen (42)

20xSSPE: 3 M NaCl

0,2 M NaH_2PO_4 pH7,4

20mM EDTA

Vorhybridisierungslösung: 5xSSPE

0,3% SDS

100ug/ml beschallte

Kalbsthymus DNA

Hybridisierungslösung: 5xSSPE

0,3% SDS

100ug/ml beschallte

Kalbsthymus DNA

30pMol ^{32}P -5'-Oligonucleotid

(3uCi/pMol)

Die Filter wurden 2h bei der theoretischen Hybridisierungstemperatur (T_H) (Berechnung siehe 3.11.) vorhybridisiert und nach folgendem Temperaturprogramm hybridisiert:

12h $T_H + 5^\circ\text{C}$ 12h T_H 12h $T_H - 5^\circ\text{C}$ 12h $T_H - 10^\circ\text{C}$

Die Filter wurden nach folgendem Temperaturprogramm gewaschen (30min in nxSSPE/0,3% SDS und 30min in nxSSPE):

 T_H

nxSSPE

-10°C	5
-10°C	2.5
-10°C	1
- 5°C	1
+ -0°C	1
+ 5°C	1
+10°C	1

Nach jedem Waschvorgang wurde
luftgetrocknet und autoradiographiert.

3.13 Cosmidisolierung (43.44)

TE-Puffer: 50mM Tris-HCl pH8/1mM EDTA

50ml LB Medium (Amp100) wurden mit einem hybridisierenden Klon direkt aus der Genbank angeimpft, über Nacht im Brutschrank inkubiert und auf je 800ml LB Medium (Amp100) überimpft. Diese Kultur wurde bis $OD_{560}=0.6$ hochgeschüttelt. anschließend pro Kolben 100mg Chloramphenicol zugegeben. über Nacht amplifiziert, abzentrifugiert und folgendermaßen weiterbehandelt:

0°C: + 11ml 20% Sucrose/50mM Tris-HCl pH8
 resuspendiert
 + 15mg Lysozym in 0,5ml 25mM Tris-HCl pH8
 5min inkubiert
 + 10ml 25mM EDTA/0.2% Triton-X100/

50mM Tris-HCl pH8

20°C: 15min inkubiert
40min 40000rpm zentrifugiert
+ 25g CsCl
+ 500ul Ethidiumbromid (10mg/ml)
22h 40000rpm zentrifugiert (Volumen 40ml)
Cosmidbande (UV) durch Anstechen entnommen und
13h 55000rpm zentrifugiert (Volumen 5ml)
Cosmidbande (UV) durch Anstechen entnommen und
5x mit 2Vol Isobutanol(TE-gesättigt) extrahiert
4h bei 0°C mit 1M LiCl/3Vol EtOH gefällt
mit 70% und 100% EtOH gewaschen und
in 500ul TE aufgenommen

Das Vorhandensein von Cosmid wurde durch Elektrophorese auf
0,5%igen Agarosegelen überprüft (15h, 60mA).

Längenmarker: HindIII/EcoRI Spaltung des Phagen λ

3.14 Restriktionsanalyse (45)

3.14.1 Restriktionsspaltung

low buffer: 10mM Tris-HCl pH7,5
10mM $MgCl_2$
1mM DTT

medium buffer: 50mM NaCl
10mM Tris-HCl pH7,5
10mM $MgCl_2$

1mM DTT

high buffer: 100mM NaCl

50mM Tris-HCl pH7.5

10mM $MgCl_2$

1mM DTT

Für die enzymatische Cosmidanalyse wurden folgende Restriktionsendonukleasen verwendet:

KpnI, SacI, Fnu4HI (low buffer)

BamHI, PstI (medium buffer)

Sall, PvuI (high buffer)

Die Spaltungen wurden einheitlich 60min bei 37°C mit 1-5units/ugDNA durchgeführt und mit 10mM EDTA (Endkonzentration) gestoppt.

3.14.2 Agarosegel (46)

Elektrodenpuffer: 36mM Tris-acetat pH7,8

(nach Loening) 30mM NaH_2PO_4

1mM EDTA

Probenpuffer: 100mM EDTA

50% Sucrose

0,1% Bromphenolblau

0,1% Xylencyanol FF

0,1% Orange G

0,5-2% Agarose in 180ml Wasser wurde kurz aufgeköcht, bei 60°C 20ml 10xLoening-Puffer zugegeben und in einer Flachbettapparatur geliert. Die Gele liefen 12-18h bei

50-80mA und wurden mit Ethidiumbromid (0.5mg/200ml Wasser) angefärbt.

Längenmarker: DNA Längenstandard III (Boehringer) (wie in 3.13)

3.14.3 Transfer auf Nitrozellulose ('Southern blot')
(47,48)

20xSSC: 3M NaCl

0,3M Nacitrat pH7.2

Die Agarosegele wurde 2x7min mit 0,25M HCl, 2x15min mit 1,5M NaCl/0,5M NaOH und 2x15min mit 1,5M NaCl/0,5M Tris-HCl pH7 behandelt und nach jedem Schritt mit dest. Wasser gespült. Die Nitrocellulose wurde 1-2h in 1xSSC eingeweicht. Der Transfer der DNA vom Gel auf den Filter wurde über Nacht mit 20xSSC durchgeführt. Der Filter wurde 2h bei 80°C gebacken.

3.14.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung der 5'-markierten Oligonukleotide gegen die auf Nitrocellulose übertragenen Restriktionsfragmente erfolgte 12h bei $T_H - 10^\circ\text{C}$ (siehe 3.11) nach Vorhybridisierung bei derselben Temperatur (Losungen siehe 3.12.4). Gewaschen wurde bei $T_H - 10^\circ\text{C}$ mit 5xSSPE (mit und ohne SDS) und bei $T_H + 10^\circ\text{C}$ mit 1xSSPE (mit und ohne SDS) (siehe 3.12.4).

3.15 DNA-Sequenzierung (49,50,51,52,53)

3.15.1 Elektroelution (54)

Restriktionsverdautes Cosmid (40ug) wurde auf 1%igem Agarosegel aufgetrennt, gefärbt und die hybridisierende

Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Das Agarozestück wurde in einen Dialyseschlauch überführt und in 1mM EDTA/5mM Na-Acetat/40mM Tris-Acetat pH7,8 in einer Elektrophoresekammer 2h bei 300V/200mA eluiert. Dann wurde 30sec umgepolt, um die DNA wieder von der Membran zu lösen. Die gelöste DNA wurde über Millipore Celluloseacetatfilter (Porengroße 0,45µm) filtriert, mit Phenol und Chloroform extrahiert, mit 1M LiCl/3Vol EtOH gefällt und in 20ul TE aufgenommen. Die eluierte DNA wurde auf 2%igen Agarose-Minigelen (1h, 50mA) überprüft.

Langenmarker: TaqI Spaltung von pBR322

3.15.2 Vektorprparation

Phosphatasepuffer: 100mM Tris-HCl pH8

5mM $MgCl_2$

0.1mM $ZnSO_4$

2µg M13mp8 wurden in 25ul 'medium buffer' mit PstI gespalten (3.14.1). Dann wurden 30ul Phosphatasepuffer und 50 units BAP (bacterial alkaline phosphatase) zugegeben. 1h bei 56°C inkubiert, mit 6ul 250mM EDTA gestoppt. 5x mit Phenol und Chloroform extrahiert, mit 1M LiCl/3Vol EtOH gefällt, gewaschen und in 20ul TE aufgenommen.

3.15.3 Ligation

Ligasepuffer: 50mM Tris-HCl pH7,4

10mM $MgCl_2$

10mM DTT

100ng Insert + 200ng dephosphorylierter M13mp8 wurden vor

der Ligation phenolextrahiert, gefällt, gewaschen und getrocknet. Nach Zugabe von 18ul Ligasepuffer, 2ul 10mM dATP in Ligasepuffer und 10units T4 DNA Ligase wurde 48h bei 60°C inkubiert.

3.15.4 Herstellen kompetenter Zellen

2xTY Medium: 1.6% Bactotrypton
 1,0% Yeast Extrakt
 0.5% NaCl

Zellen des E.coli Stammes BMH71.18 wurden in 2xTY Medium über Nacht hochgeschüttelt, 40ml 2xTY mit 0.5ml davon überimpft und bis $OD_{560}=0,6$ inkubiert und folgendermaßen weiterbehandelt:

0°C: zentrifugiert
 resuspendiert mit 20ml 100mM $CaCl_2$
 zentrifugiert
 resuspendiert mit 10ml 100mM $CaCl_2$
 zentrifugiert
 resuspendiert mit 2ml 100mM $CaCl_2$
 30min stehengelassen

3.15.5 Transformation

Weichagar: 1% Bactotrypton
 0.8% NaCl
 0.8% Agar
 1mM $MgSO_4$

IPTG-Platten: 2xTY Medium
 1,5% Agar

50mg/l IPTG

Der Ligationsansatz wurde 200ul der kompetenten Zellsuspension zugesetzt, 30sec auf 37°C erwärmt und 60min bei 0°C inkubiert. Der Ansatz wurde in drei Teile (30ul, 60ul, 120ul) aufgeteilt und hintereinander folgendermaßen weiterbehandelt:

3min auf 42°C erhitzt

+ 100ul BMH71.18 über Nacht Kultur

+ 2,5ml Weichagar (auf 42°C erwärmt)

+ 30ul frisch hergestelltes 2% xGal in DMF

gemischt und auf IPTG-Platte gegossen

nach Erstarren bei 37°C im Brutschrank inkubiert

3.15.6 Einzelstrangisolierung

Rekombinante Phagen ('plaques') wurden auf 1,5ml 2xTY Medium + 20ul über-Nacht Kultur (BMH71.18) überimpft, 4-5h bei 37°C inkubiert, zentrifugiert und das Pellet verworfen. Die Einzelstranglösung (1,2ml) wurden mit 200ul 2,5M NaCl/20% PEG6000 versetzt und 15min bei RT stehen gelassen. Die Phagen wurden abzentrifugiert, in TE mit Phenol und Chloroform extrahiert, mit 0,3M Acetat/3Vol EtOH gefällt und in 20ul TE gelöst.

3.15.7 Sequenzierung nach Sanger

Klenow-Puffer: 100mM Tris-HCl pH8,5

100mM $MgCl_2$

Farbmarker: 0,03% Xylencyanol FF

0.03% Bromphenolblau

100% Formamid

20mM EDTA

Alle Didesoxynukleotidmischungen enthielten:

2mM DTT, 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM Tris-HCl pH7,9

2'3'-didesoxy Adenosinmix:

40uM ddATP, 70uM dCTP, 280uM dITP, 70uM dTTP

2'3'-didesoxy Cytidinmix:

56uM ddCTP, 7uM dCTP, 280uM dITP, 70uM dTTP

2'3'-didesoxy Guanosinmix:

60uM ddGTP, 108uM dCTP, 42uM dITP, 108uM dTTP

2'3'-didesoxy Thymidinmix:

600uM ddTTP, 108uM dCTP, 300uM dITP, 11uM dTTP

Zu 5ul Phagen-DNA (0,5pMol) wurden 1ul primer (0,1pMol), 1,5ul Klenow-Puffer und 2,5ul H_2O gegeben und 1h bei 56°C hybridisiert ('annealing'). Dann wurden 2ul (α - ^{35}S)dATP (25pMol) und 1ul (1unit) Klenow Polymerase (large fragment) zugesetzt. Der Ansatz wurde zu je 2,5ul in vier Teile geteilt, 2ul von je einem der vier Nucleotidmixe (s.o.) zugefügt und 20min bei RT polymerisiert. Nach Zugabe von 2ul chase solution (2mM dNTP) wurde 15min bei RT inkubiert. 4ul Farbmarker zugegeben, 3min auf 100°C erhitzt und aufs Gel aufgetragen.

3.15.8 Sequenzierungsgel

10xTBE: 1M Tris

1M Borsaure

25mM EDTA

Lösung I: 1,6ml 38.7% Acrylamid/1.3% Bis

4.0ml 10xTBE

1,6ml 25% Sucroselösung

0,8ml H₂O

12ul TEMED

12ul 25% Persulfat

Lösung II: 8,0ml 38.7% Acrylamid/1.3% Bis

2.0ml 10xTBE

30,0ml H₂O

60ul TEMED

60ul 25% Persulfat

Die Deckplatte wurde mit 5ml Chloroform + 250ul Dichlordimethylsilan ('Repelsilan') behandelt. Zur Elektrophorese wurde ein Puffergradientengel (51) (500x200x 0.35mm) verwendet. Es wurde durch sukzessive Zugabe von 5ml Lösung I und 30ml Lösung II gegossen.

Elektrodenpuffer: 1xTBE

Laufbedingungen: 2000V, 40mA, 2-3h. Metallplatte zur
Wärmeverteilung

Nach der Elektrophorese wurde die mit Repelsilan behandelte Glasplatte abgenommen, die DNA durch Auflegen eines Eisessig/Methanol/ Wasser 1:1:8 getränkten Whatman 3MM Papiers fixiert und das Gel durch vorsichtiges Abheben der zweiten Glasplatte auf ein trockenes Whatman 3MM Papier transferiert. Das Gel wurde mit Haushaltsfolie abgedeckt. im

Vakuum getrocknet und 3-5 Tage autoradiographiert.

3.16 'Dot blot' Analyse

Nitrocellulosefilter wurden 10min in Wasser und 1h in 20xSSC (3.14.3) eingeweicht und in die 'Dot blot' Apparatur (Minifold) eingespannt. Die DNA Probe (in 30ul TE-Puffer) wurde 5min auf 100°C erhitzt. Dann wurden 30ul 1M NaOH zugefügt, 20min bei RT inkubiert, 30ul 1M HCl/1M NaCl/0.5M Tris-HCl pH7,5 zugesetzt und auf Nitrocellulose aufgetragen. Daraufhin wurde mit je 100ul 6xSSC und 20xSSC gewaschen und bei 80°C gebacken. Vorhybridisierung, Hybridisierung und Waschen erfolgte wie unter 3.14.4 beschrieben.

3.17 Sequenzvergleich (55,56,57)

Verwandtschaft zwischen zwei Proteinen kann sich grundsätzlich auf verschiedene Kriterien beziehen: Chemische Funktion, aktives Zentrum, prosthetische Gruppen, ungewöhnliche Aminosäuren oder Aminosäurezusammensetzung, Tertiärstruktur, Wechselwirkung mit anderen Molekülen oder immunologische Eigenschaften. In dieser Arbeit wurden Aminosäuresequenzen miteinander verglichen unter Anwendung von zwei Arten von Homologievergleich: Mit Hilfe des Computerprogramms ALIGN wird die beste Angleichung zweier Sequenzen vorgenommen. Mit Hilfe des Computerprogramms RELATE werden alle Fragmente einer bestimmten Länge der einen Sequenz mit allen gleichlangen Fragmenten der anderen Sequenz verglichen. Beide Programme basieren auf der

Annahme, daß Homologie dann besteht, wenn sich zwei Sequenzen mehr ähnlich sind als dies beim Vergleich zweier reiner Zufallssequenzen der Fall wäre. Bei beiden Verfahren braucht man einen Bewertungsmaßstab, der numerisch das Maß der Homologie angibt. Das Ergebnis dieser Berechnung wird in Beziehung gesetzt zum Vergleich einer großen Anzahl (in dieser Arbeit 100) von reinen Zufallssequenzen derselben Aminosäurezusammensetzung mit der gegebenen Sequenz. Das Ausmaß an Homologie zwischen den verglichenen wirklichen Sequenzen und den verglichenen Zufallssequenzen wird zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dieses Verhältnis ergibt das Maß nicht zufälliger Homologie, dh. echter Homologie. Jede Übereinstimmung zweier Aminosäuren bekommt je nach Bewertungsmatrix einen bestimmten Wert. Unterbrechung einer Sequenz zum Zwecke größerer Homologie beim ALIGN Programm wird mit Punktabzug bestraft. Die höchste Summe, die beim Angleichen zweier Sequenzen erzielt werden kann, wird verglichen mit den höchsten Summen beim Vergleich der entsprechenden Zufallssequenzen. Das Ergebnis bei ALIGN (alignment score) ist die höchste Summe (maximum score) beim Vergleich der wirklichen Sequenzen geteilt durch die durchschnittlich höchste Summe (maximum score) beim Vergleich der Zufallssequenzen. Bei RELATE tritt an die Stelle des alignment score der segment comparison score. Dazu finden im allgemeinen drei Bewertungsmatrices Anwendung:

- a) Der einfachste Maßstab ist die Bewertung einer Aminosäureübereinstimmung mit 1 und die Nichtübereinstimmung

mit 0 (unitary matrix).

b) Zur Entdeckung entfernter Verwandtschaften wird die Übereinstimmung zweier Aminosäuren nicht absolut genommen wie bei a), sondern relativ als "Verwandtschaft" zweier Aminosäuren untereinander (mutation data matrix). Das Kriterium ist gewissermaßen die Auswirkung eines Aminosäureaustausches auf Sekundärstruktur und Tertiärstruktur eines Proteins. Auch die Übereinstimmung zweier Aminosäuren wird je nach Art und Häufigkeit der entsprechenden Aminosäure unterschiedlich bewertet.

c) Zwei Aminosäuren können auch verglichen werden im Bezug auf den genetischen Code. Die Homologie der Triplettcodons zweier Aminosäuren wird verglichen (genetic code matrix):

gleiche Aminosäure	3 Punkte
zwei Basen identisch	2 Punkte
1 Base homolog	1 Punkt
keine Homologie der beiden codons	0 Punkte

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der mutation data matrix gearbeitet.

4. Ergebnisse

4.1 Trennung und Immunologie der Untereinheiten

Das Enzym braucht für Stabilität und Aktivität hohe Ionenstärken. Die Enzymanreicherung wird deshalb in Gegenwart von 3M KCl durchgeführt. Dieses Ionenmilieu ändert sich im Verlaufe der Reinigung nur bei Ammoniumsulfatfällung (3,5M NH_4SO_4) und Aussalzungschromatographie (1,8-2,0M NH_4SO_4) und wird danach durch Salzaustausch gegen 3M KCl wiederhergestellt.

4.1.1 Trennung der Untereinheiten

Das Enzym besitzt wie die meisten halobakteriellen Proteine einen Überschuß an sauren Aminosäuren. Die hohe Salzkonzentration im Zellinnern verringert die gegenseitige Abstoßung der negativen Ladungen auf der Moleküloberfläche und begünstigt zur Erhöhung der Lösungsmittelentropie hydrophobe Wechselwirkungen, die bei halobakteriellen Proteinen absolut dominieren. Ionische und polare Wechselwirkungen sind dagegen durch das viele Salz geschwächt und spielen im Gegensatz zu ihrer Funktion in allen Zellen mit 'normalem' Ionenmilieu eine untergeordnete Rolle. Diese Bedingungen sind absolut spezifisch für halophile Organismen und haben fundamentale Konsequenzen für die Struktur dieser Proteine.

Der Gehalt an schwach hydrophoben ('border line') Aminosäuren ist stark erhöht, der an hydrophoben Aminosäuren dagegen nicht auffallend hoch (11).

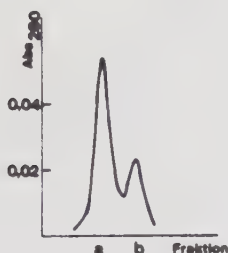


Abb.5. Trennung der Untereinheiten der Pyruvat-Ferredoxin--Oxidoreduktase durch Einfrieren auf -70°C und Auftauen auf 4°C und anschließende Gelfiltration auf AcA44. Analyse von Peak a und b siehe Abb.6.



Abb.6. SDS-PAGE der Fraktionen a und b der Gelfiltration von Abb.5

Es ist daher anzunehmen, daß beim Zusammenhalt der

Untereinheiten der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase hydrophobe Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielen.

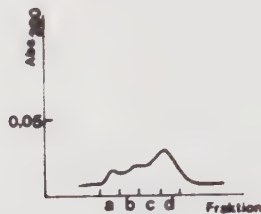


Abb.7. Trennung der Untereinheiten der Pyruvat-Ferredoxin--Oxidoreduktase durch Inkubation bei 4°C in 0.05% Triton X-100/1mM DTT/3M KCl/50mM TrisHCl pH8.0 und Gelfiltration auf Aca44 in 0.01% Triton X-100/1mM DTT/3M KCl/50mM TrisHCl pH8.0. Analyse der Peaks a-d siehe Abb.8.



Abb.8. SDS-PAGE der Fraktionen a-d der Gelfiltration von Abb.7

Einsatz von Detergentien und Erniedrigung der Ionenstärke sollte deshalb die Assoziation der Untereinheiten

abschwächen. Es wurde weiterhin beobachtet, daß das Enzym nach Einfrieren und Auftauen an Aktivität verliert. Ein möglicher Grund wäre die Dissoziation der Untereinheiten. In allen drei genannten Fällen konnten die beiden Untereinheiten getrennt werden.

1) Nach fünfmaligem Einfrieren (-70°C) und Auftauen (4°C) des nativen Enzyms ($7,5\text{mg/ml}$) wurde die Probe auf einer AcA44 Säule ($0,8 \times 100\text{cm}$) in $1\text{mM DTT}/3\text{M KCl}/50\text{mM TrisHCl pH}8,0$ über Molekularsieb filtriert (Abb.5a,b). Wie die gelelektrophoretische Analyse (Abb.6a,b) der Elutionspeaks a und b zeigt, bleibt ein Teil des Enzyms undissoziiert (Abb.6a). Die große Untereinheit erscheint im Eluat, während die kleine Untereinheit möglicherweise als Monomer oder Oligomer auf der Säule präzipitiert.

2) Behandlung mit Detergens (30min Inkubation bei 4°C mit $0,05\%$ Triton X-100/ $1\text{mM DTT}/3\text{M KCl}/50\text{mM TrisHCl pH}8,0$ und Elution in $0,01\%$ Triton X-100/ $1\text{mM DTT}/3\text{M KCl}/50\text{mM TrisHCl pH}8,0$) führte zur Isolierung der beiden Untereinheiten (Abb.7a,d und 8a,d), doch war die Dissoziation unter diesen Bedingungen nicht vollständig. Das Elutionsprofil (Abb.7) zeigt drei Peaks. Die gelelektrophoretische Analyse (Abb.8) zeigt, daß die erste Fraktion die große Untereinheit (Spur a) (als Dimer oder Oligomer?) enthält, die zweite und dritte Fraktion ein Gemisch aus kleiner und großer Untereinheit (undissoziierten Anteil) (Spur b und c) und die vierte Fraktion die kleine Untereinheit (Spur d) enthält. Auch veränderte Bedingungen brachten keine besseren Trennergebnisse: a) Elution mit $0,1\%$ Triton X-100 bei sonst gleichem

Puffer statt 0.01% Triton X-100 im selben Puffer oder b) Weglassen von DTT.

3) Bei Verringerung der Ionenstärke konnte quantitative Dissoziation in α (Abb.9a und 10a) und β (Abb.9b und 10b) erreicht werden.

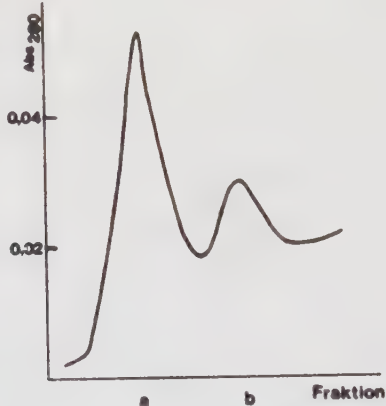


Abb.9. Trennung der Untereinheiten der Pyruvat-ferredoxin--Oxidoreduktase durch Reduktion der Ionenstärke während der Gelfiltration. Analyse der Peaks a und b siehe Abb.10.



Abb.10. SDS-PAGE der Fraktionen a und b der Gelfiltration von Abb.9

Die native Enzymprobe in 1mM DTT/3M KCl/50mM TrisHCl pH8

wurde auf die Säule aufgetragen und mit 1mM DTT/10mM TrisHCl pH8 eluiert. Dabei erfolgte die Erniedrigung der Salzkonzentration während der Gelfiltration. Keine Trennung wurde erzielt a) bei Elution mit 1mM EDTA/1mM DTT/10mM TrisHCl pH8,0 und b) nach Erniedrigung der Ionenstärke durch Ultrafiltration vor der Gelfiltration. Im letzteren Fall erfolgte wahrscheinlich irreversible Aggregation im dissoziierten Zustand. Am besten war die Trennung bei 1-5mM DTT und 10-50mM TrisHCl. Elution bei tieferer (2mM TrisHCl) oder höherer (zusätzlich 0,1M KCl) Ionenkonzentration verschlechterte das Trennergebnis.

Das Eisen-Schwefel Zentrum wurde in allen Fällen zerstört. Keine der isolierten Untereinheiten zeigte Absorption bei 400nm oder enthielt Thiamindiphosphat.

4.1.2 Immunologischer Vergleich

Um die Untereinheiten für die Immunisierung möglichst rein zu erhalten, wurden sie über präparative SDS-PAGE isoliert. Die Antikörper (Ak) gegen die große (α) und die kleine (β) Untereinheit der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase wurden im 'Western blot' Verfahren auf Reaktion mit Rohextrakt (R), gereinigter Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (P) und gereinigter 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (O) getestet (Abb.11,12).

Das Antiserum gegen α (Ak α) reagiert (Abb.11)

- a) im Rohextrakt mit einer Hauptbande (α) und mehreren Nebenbanden (Proteolysprodukte?)
- b) in der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase mit α und mehreren Nebenbanden (Proteolyseprodukte?)
- c) in der 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase mit den selben Banden wie unter b), aber viel schwächer.

Das Antiserum gegen β (Ak β) reagiert (Abb.12)

- a) im Rohextrakt mit einer einzigen Bande (β)
- b) in der gereinigten Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase mit β als Hauptbande und sehr schwach mit α
- c) in der gereinigten 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase ausschließlich mit β .

Als Ergebnis läßt sich festhalten, daß

- 1) die große Untereinheit vermutlich sehr proteolyseanfällig ist,
- 2) Ak β in beiden Enzymen spezifisch mit β und
- 3) Ak α in beiden Enzymen mit denselben Banden reagiert.

wobei die 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase schwach,
die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase stark reagiert.

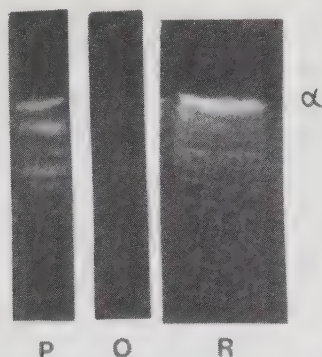


Abb.11. 'Western blot' Analyse und Detektion der Bindung des polyklonalen Antikörpers gegen die große Untereinheit (α) der Pyruvat-Ferredoxin- Oxidoreduktase durch FITC-markierten Anti-Kaninchen Antikörper (aus Ziege). R=Rohextrakt, P=Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, O=2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

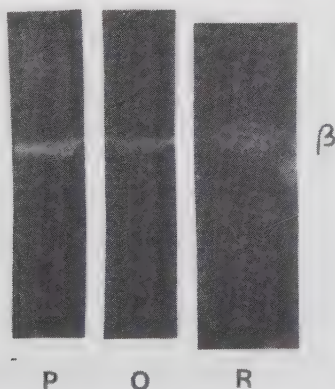


Abb.12. 'Western blot' Analyse und Detektion der Bindung des polyklonalen Antikörpers gegen die kleine Untereinheit (β) der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase durch FITC-markierten Anti-Kaninchen Antikörper (aus Ziege). R=Rohextrakt, P=Pyruvat-Ferredoxin- Oxidoreduktase, O=2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

4.2 Lokalisation des FeS Zentrums

4.2.1 Carboxymethylierung

Die Liganden des Eisen-Schwefel Zentrums sind Cysteine. Tab.1 zeigt die Anzahl der Cysteine, die sich im nativen und denaturierten Zustand carboxymethylieren lassen. Dabei werden 3,7mol Cysteine/mol Enzym im nativen und 11,1mol Cysteine/mol Enzym nach Denaturierung mit Harnstoff modifiziert. Modifizierte und nicht modifizierte Cysteine wurden auf folgende Weise bestimmt: Der Gesamtcysteingehalt pro mol Enzym beträgt nach (9) 18,5 mol, nach eigener Analyse 20,2mol (berechnet aus der Cysteinbestimmung der getrennten Untereinheiten: die große Untereinheit (α) enthält 6,5 Cysteine und die kleine Untereinheit (β) 3,6 Cysteine). Im nativen Zustand wurden nach Derivatisierung 3,7mol Carboxymethylcystein (Tab.1) gefunden, dh. 16,5mol wurden nicht modifiziert. Im denaturierten Zustand wurden nach Derivatisierung 11,1mol Carboxymethylcystein (Tab.1) gefunden, dh. 9,1mol wurden nicht modifiziert. Diese nicht modifizierten Cysteine können jedoch auch direkt bestimmt werden: Bei Behandlung mit Perameisensäure wird Carboxymethylcystein zum Sulfon oxidiert. Dieses Oxidationsprodukt wird bei salzsaurer Hydrolyse zerstört (58). Deshalb kann bei gleichzeitigem Vorhandensein von Cystein und Carboxymethylcystein in der Probe das Cystein als Cysteinsäure durch Standard-Perameisensäureoxidation

bestimmt werden, ohne daß Carboxymethylcystein oder Carboxymethylcysteinsulfon die Cysteinbestimmung stört. Bei der Anwendung dieses Verfahrens auf die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase wurden nach Carboxymethylierung und Perameisensäureoxidation im nativen Zustand 16,4mol (Tab.1) (bei Differenz von Gesamtcystein und Carboxymethylcystein 16,5mol) und im denaturierten Zustand 8,5mol (Tab.1) (bei Differenz von Gesamtcystein und Carboxymethylcystein 9,1mol) Cysteinsäure gefunden.

	$\frac{\text{molCSO}_3\text{H}}{\text{molEnzym}}$	$\frac{\text{molCmC}}{\text{molEnzym}}$	Summe
natives Enzym	16,4	3,7	20,1
denaturiertes Enzym	8,5	11,1	19,6
Differenz	7,9	7,4	

Tab.1. Aminosäureanalyse der Cysteine nach S-Carboxymethylierung (CmC=Carboxymethylcystein) des nativen und denaturierten Enzyms. Nicht modifizierte Cysteine wurden nach Perameisensäureoxidation als Cysteinsäure (CSO_3H) bestimmt.

Unklar ist, warum 8,5mol Cysteine (Tab.1) selbst unter denaturierenden Bedingungen nicht carboxymethyliert werden. Diese 8,5mol sind entweder Cystine, die von DTT nicht reduziert werden konnten oder Cysteine, die für Iodessigsäure nicht zugänglich sind. Bei Denaturierung mit Harnstoff in Gegenwart von 30fachem Überschuß an DDT und 300fachem

Überschuß an Iodessigsäure über Cystein sollte die Carboxymethylierung eigentlich quantitativ sein.

Das Eisen-Schwefel Zentrum wird bei Denaturierung mit Harnstoff zerstört. Deshalb sollten sich unter den 7,4mol (Tab.1: CmC-Bestimmung) bzw. 7,9mol (Tab.1: CSO_3H -Bestimmung) Cysteine, die nach Denaturierung zusätzlich modifiziert werden, zumindest teilweise die Cysteine befinden, die das FeS Zentrum ligandieren. Die Tatsache, daß nach Zerstörung der Eisen-Schwefel Cluster ca. 8 Cysteine frei werden, sollte die Lokalisierung der Cluster durch radioaktive Markierung ermöglichen.

4.2.2 Radioaktive Markierung

Um festzustellen, ob die beiden FeS Cluster ausschließlich auf der großen oder kleinen Untereinheit liegen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Zuerst wurden die Cysteine im nativen Zustand carboxymethyliert.

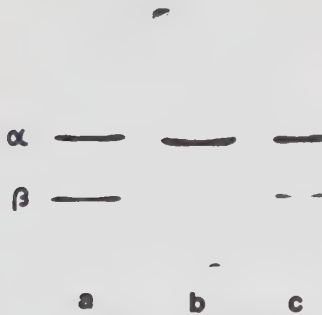


Abb.13. Cysteinmarkierung mit ^{14}C -Iodessigsäure unter Denaturierung nach Carboxymethylierung des nativen Enzyms. a=SDS-PAGE des Enzyms nach Coomassiefärbung, b=Autoradiogramm des Gels nach radioaktiver Markierung bei Harnstoffbehandlung, c=Autoradiogramm des Gels nach radioaktiver Markierung bei Zerstörung des FeS Zentrums mit o-Phenanthrolin

Daraufhin wurde ^{14}C -Iodessigsäure in substoichiometrischer Menge zugesetzt (stoichiometrische Mengen führen zur Markierung beider Untereinheiten) und das Eisen-Schwefel Zentrum entweder durch Denaturierung mit Harnstoff oder durch Komplexierung des Eisens mit o-Phenanthrolin zerstört. Dabei sollten die freiwerdenden Cysteine ^{14}C -carboxymethyliert werden. Bei Harnstoffbehandlung wird ausschließlich die große Untereinheit markiert (Abb.13b). Bei o-Phenanthro-

linbehandlung werden große und kleine Untereinheit im Verhältnis 4:1 markiert (Abb.13c). Das Ergebnis mit Harnstoff führt zu dem Schluß, daß sich die Cluster auf α befinden. Es kann jedoch auf Grund der schwachen Markierung der kleinen Untereinheit nach o-Phenanthrolinbehandlung nicht ausgeschlossen werden, daß auch die kleine Untereinheit an der Ligandierung des Eisen-Schwefel Zentrums beteiligt ist. Harnstoff ist aber gegenüber o-Phenanthrolin das eindeutig unspezifischere Reagens in Bezug auf die Freisetzung von im nativen Zustand nicht reaktiven Cysteinen. Deshalb muß man aus der ausschließlichen Markierung der großen Untereinheit nach Harnstoffbehandlung dh. Zerstörung des Eisen-Schwefel Zentrums schließen, daß alle Cysteine, die im nativen Zustand das FeS Zentrum ligandieren und deshalb nicht modifizierbar sind, auf der großen Untereinheit liegen.

4.3 Isolierung der Cysteinpeptide

4.3.1 Kopplung an Thioisäule

Die oben angewandte Methode, SH-Gruppen durch Harnstoff freizusetzen, wurde benutzt, das Enzym über die Cysteine, die das Eisen-Schwefel Zentrum binden, an eine Thioisäule zu koppeln. Den Erfolg der Kopplung zeigt die Gelelektrophorese des Eluates, das nur die kleine Untereinheit enthält (Abb.14). Wird direkt nach der Kopplung wieder mit DTT eluiert, erscheint ausschließlich die große Untereinheit im

Eluat. Der gekoppelte Polypeptidanteil wurde auf der Säule tryptisch gespalten, nicht kovalent gebundene Peptide durch Waschen entfernt und die disulfidgebundenen Peptide nach Reduktion zur Thiolform eluiert.



Abb.14. Kopplung des S-carboxymethylierten nativen Enzyms an Thiopropyl-Sepharose 4B in Gegenwart von 4M Harnstoff. a=unbehandeltes Enzym, b=Eluat nach Thiolkopplung

Von den 20,2 Cysteinen im Holoenzym reagieren 3,7 im nativen Zustand, während 3,5 Cysteine selbst unter denaturierenden Bedingungen nicht reagieren (Tab.1). Es ist deshalb anzunehmen, daß die 8 Cysteine, die bei Denaturierung mit Harnstoff freigesetzt werden, auf der großen Untereinheit liegen und das Eisen-Schwefel Zentrum ligandieren. Folglich sind die Peptide, die nach Thiolkopplung isoliert werden, die Peptide, die diese Cysteinreste tragen und liegen deshalb auf der großen Untereinheit.

4.3.2 HPLC-Trennung und Sequenzierung

Die Peptide wurden für die Aminosäureanalyse (Tab.2) S-carboxymethyliert (Abb.15) und für die Sequenzanalyse (Tab.3) S-methyliert (Abb.16). Der Grund für diese verschiedene Modifizierung liegt in der Detektierbarkeit der Derivate unter Standardbedingungen. S-Methylcystein fällt bei der routinemäßigen Aminosäureanalyse mit Prolin zusammen, während S-Carboxymethylcystein vor Asparaginsäure eluiert. Bei der Sequenzanalyse dagegen eluiert in der HPLC-Analyse der PTH-Derivate PTH-S-Carboxymethylcystein zusammen mit PTH-Asparaginsäure und ist schwierig zu spezifizieren. Der Elutionspunkt von PTH-S-Methylcystein dagegen liegt unverwechselbar zwischen PTH-Alanin und PTH-Methionin.

Abb.15 und Abb.16 zeigen die sechs analysierten Peptide I-VI. Die beiden prominenten Peaks in Abb.16 zwischen Peptid I und II sind keine Peptide. Sie sind Artefakte der Methylierung und erscheinen nicht bei der Carboxymethylierung (Abb.15). Peptid IV enthält wahrscheinlich zwei Cysteine (siehe unten) und eluiert nach S-Methylierung (Abb.16) auf der 'reversed phase' Säule infolge zweifacher Derivatisierung und damit höherer Hydrophobizität relativ später als nach S-Carboxymethylierung (Abb.15). Die Ausbeute der Peptide, berechnet nach der Menge der N-terminalen PTH-Aminosäure und bezogen auf die Gesamtmenge des eingesetzten Enzyms, belief sich zwischen 5 und 40 Prozent. Jedes Peptid wurde zur Bestätigung der Sequenz mindestens zweimal aus unterschiedlichen Isolierungsansätzen

sequenziert.

	I		II		III		IV		V		VI	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Asp	1,0	1	3,4	4	1,0	1	5,0	4	2,0	1	4,3	4
Thr	0,9		1,7	2	0,9	1	1,7	1(2)	2,6	2	1,5	2
Ser			3,8	3(5)	0,9	1	1,1	1	3,3	4		
Glu	3,6		5,6	6	3,1	3	4,7	4(5)	2,7	1(2)	3,3	3
Pro	2,0	2	1,8	2	0,6	1	3,6	4	nd	(1)	1,0	1
Gly	1,0	1	3,3	3	4,5	5	4,3	1(2)	2,4	1(2)	1,1	1
Ala	0,9	1	3,6	4	2,7	3	2,7	3	4,5	3	1,8	2
Cys	0,8		0,9		0,9	1	0,9	1(2)	0,6	1	1,0	1
Val	0,9	1	2,2	3			2,6	2	0,9	1	1,6	2
Met			1,2	2	0,8	1			0,7	1		
Ile			1,7	2	1,6	2	1,0	1			2,2	2
Leu			1,8	2	2,6	3	1,0		3,0	2	nd	2
Tyr	1,0		1,7	2								
Phe	1,4	1					2,7	2	1,6	2	1,5	2
Lys	2,0	2			1,8	1(2)	1,0				1,0	(1)
His			3,7	4							2,2	2
Arg	1,2		1,0				2,1	2	1,0			
Trp	nd		nd		nd		nd		nd		nd	(1)
%Ausbeute	10-30		10-20		20-40		5-10		5-10		10-20	

Tab.2. Aminosäureanalyse (a) der Peptide I-VI und Vergleich mit den in der Sequenzanalyse (b) wiedergefundenen Aminosäuren. Werte in Klammern schließen unsichere Positionen (siehe Klammern in Tab.3) mit ein. nd=nicht bestimmt

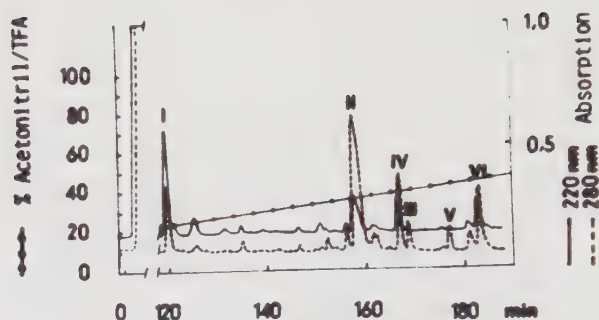


Abb.15. HPLC-Analyse der S-carboxymethylierten Cysteinpeptide I-VI auf einer RP18 10µm Säule (Merck). Es wurde das gesamte DTT-Eluat der Thiopropyl-Sepharose Säule derivatisiert und injiziert.

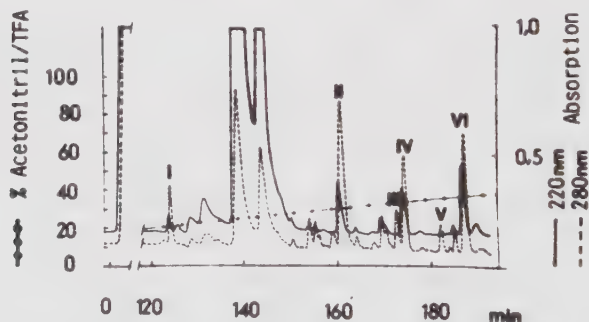


Abb.16. HPLC-Analyse der S-methylierten Cysteinpeptide I-VI auf einer RP18 10µm Säule (Merck). Es wurde das gesamte DTT-Eluat der Thiopropyl-Sepharose Säule derivatisiert und injiziert.

I	ValAlaPheGlyProLysAspProLys
II	AspAlaTyrGluGlnVal(Ser)GluMetGlu HisThrHisAspLeuSerValProThrGly (Ser)HisAspGluProGlnValLeuMetSer GlySerHisAlaIleAlaTyrGlyAlaIle Asp
III	GlyAlaMetAlaGluLeuGlyLysAspPro GluGluIleLeuLeuAlaThrGlyIleGly <u>CysSerGly(Lys)</u>
IV	AlaPheSerAlaIleAspGluAspArgGlu ValAspArgAspAlaPheThrProGlyVal GluProGlnPro(Thr)GlnCysPro(Gly)Cys)
V	GlyAlaSerLeuMetThrAspValSerSer AlaThrSerPhePhe(Glu)Pro(Gly)LeuGln AlaCys
VI	AspIleLeuValGluAlaIleGlnHisAsp GlyPheAlaHisValAspPheLeuThrGln CysProThr(Tro)Asn(Lys)

Tab.3. Sequenzanalyse der Peptide I-VI durch Edman-Abbau in einem Prototyp-Sequenator nach der 'spinning cup' Version. Aminosäuren, die bei der HPLC-Analyse der PTH-Derivate nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnten, wurden in Klammern gesetzt. In Peptid II ist die Teilsequenz, aus der die beiden Oligonukleotide abgeleitet sind, unterstrichen. In Peptid III ist der Peptidabschnitt unterstrichen, der die im Text beschriebene Homologie mit der Nitrogenase Reduktase zeigt.

Korrekte Trypsinspaltung wird bestätigt durch komplette Sequenz von Peptid III und VI, die mit Lysin enden, obgleich das terminale Lysin als PTH-Aminosäure im HPLC-Lauf nicht mehr eindeutig zu sehen war. Doch kann seine Position als sicher gelten, weil die Aminosäureanalyse für Peptid III zwei Lysine und für Peptid VI ein Lysin erfordert. Ansonsten stimmt die Sequenz beider Peptide mit der Aminosäureanalyse überein. Peptid II ließ sich bis Aminosäure 41 sequenzieren. Nach Aminosäureanalyse fehlen nur ein Cystein und das C-terminale Lysin. Bei zwei Peptiden (IV und V) ließen sich jeweils etwa 7 C-terminale Aminosäuren nicht sequenzieren. Ein Grund dafür ist die geringe Ausbeute (5-10%) beider Peptide. Bei Peptid I konnte nur etwa die Hälfte (9 von ca. 18 Aminosäuren) sequenziert werden. Die beiden kurz aufeinanderfolgenden Proline verhinderten quantitative Abspaltung, so daß infolge starker Peaküberschneidung ('memory'-Effekt bei unvollständiger Abspaltung) bei der HPLC-Analyse der PTH-Derivate die weitere Sequenzanalyse nicht mehr möglich war.

Zwei Peptide (I und III) enthalten in der Sequenz Lysine, an welchen unter Standardbedingungen der Trypsinspaltung nicht gespalten wurde. Bei 50facher Menge an Trypsin werden diese Peptide jedoch gespalten und verschwinden im HPLC-Diagramm. Dagegen bleiben die beiden Argininstellen in Peptid IV (Arg-Glu und Arg-Asp) selbst unter drastischen proteolytischen Bedingungen ungespalten.

Laut Aminosäureanalyse enthält jedes Peptid ein Cystein. Die Sequenzanalyse zeigt jedoch, daß Peptid IV wahrscheinlich

ein zweites Cystein hat, was sich durch sein Retentionsverhalten bei der HPLC-Trennung nach S-Methylierung bzw. S-Carboxymethylierung bestätigt (Abb.15 und 16). Beim Edman-Abbau von Peptid I und II wurde infolge unvollständiger Sequenz kein Cystein gefunden.

Bei allen Ferredoxinen und einigen Enzymen, die (4Fe-4S) Cluster besitzen, findet man in der Aminosäuresequenz eine charakteristische Anhäufung von Cysteinen: Cys x x Cys x x Cys x x x CysPro (x=Aminosäure). Dieses Cysteinmuster, das bis zur Entdeckung von anderen Cysteinliganden (s.u.) als obligatorisch für (4Fe-4S) Proteine galt, wurde bei der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase nicht gefunden.

Zwei mögliche Gründe sind denkbar: 1) Es kann ausgeschlossen werden, daß zwei Peptide mit dem typischen Cysteinmuster bei der Isolierung über Thiolsepharose verloren gingen. Wie bereits erwähnt, läßt sich die große Untereinheit nach Kopplung an die Säule (ohne Trypsinspaltung) mit DTT eluieren. Die kleine Untereinheit erscheint dabei nicht mehr im Eluat, weil sie bei der Thiolkopplung nicht gebunden und damit abgetrennt worden war (Abb.14). Es sollten daher unter unseren Bedingungen alle Disulfidbrücken gespalten werden und keine Peptide auf der Säule zurückbleiben. Daraus folgt, daß das oben erwähnte, für 4Fe4S Proteine typische Cysteinmuster auf den Polypeptidketten der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase nicht vorkommt.

2) Eine andere Möglichkeit ist das Vorhandensein von tryptischen Spaltstellen (Lysin oder Arginin) zwischen den vier Cysteinen. Dort wurde bei einigen Ferredoxinen Lysin

gefunden, nie aber Arginin. (2Fe-2S) Ferredoxine sind durch die Cysteinanordnung Cys x x x x Cys x x Cys charakterisiert. Hier befindet sich oft Arginin hinter dem ersten Cystein. Andere Lysin- oder Argininpositionen sind nicht bekannt. Die Cysteine in Peptid III-VI zeigen jedoch bei Betrachtung ihrer Nachbaraminosäuren keinerlei Ähnlichkeit mit bekannten Cysteinmustern.

Es wurde eine überraschende kurze Sequenzhomologie zwischen den letzten 7 Aminosäuren in Peptid III und einer FeS Cluster Bindungsstelle in allen fünf bisher bekannten Nitrogenase Reduktase Fe-Proteinsequenzen gefunden (59):

Nitrogenase Reduktase G-V-G-C-A-G-R

Peptid III G-I-G-C-S-G-(K)

Die Nitrogenase Reduktase ist jedoch ein Dimer von zwei identischen Untereinheiten und besitzt pro Untereinheit zwei Cysteine, die ein (4Fe-4S) Zentrum ligandieren. Das Cluster überbrückt beide Untereinheiten. Die oben angegebene Sequenz enthält eines dieser beiden Cysteine. Größere Homologien zwischen der Nitrogenase Reduktase und den Peptiden der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase wurden nicht gefunden. Wenn Peptid III an der Clusterbindung beteiligt ist, dann könnten beide Enzyme das Cluster in ähnlicher Weise ligandieren. Die Ausbeute von Peptid III ist die höchste von allen Peptiden (20-40%). Das steht in Einklang mit der Erwartung, daß die FeS Cluster bindenden Peptide die Hauptprodukte bei der Peptidisolierung über Thiol-Sepharose sind. Eine Überbrückung zweier Untereinheiten wie bei der

Nitrogenase erscheint jedoch auf Grund der ausschließlichen radioaktiven Markierung (s.o.) der großen Untereinheit nach Harnstoffbehandlung eher als unwahrscheinlich. Es kann jedenfalls als gesichert gelten, daß sich Peptid III als Hauptprodukt der Peptidisolierung und als Ligand des FeS Zentrums auf der großen Untereinheit befindet.

4.4 Oligonukleotide als 'probe' für das Enzymgen

4.4.1 cDNA Synthese

Durch reverse Transkription sollte die Spezifität von synthetischen Oligonukleotidgemischen getestet werden, die als Hybridisierungsproben für das 'screening' einer Cosmidbank des halobakteriellen Genoms dienen sollten (siehe unten). Von allen sechs Peptiden enthält Peptid II die Teilsequenz mit dem geringsten Entartungsgrad bezüglich der entsprechenden Triplettcodons.

(Ser)GluMetGluHisThrHisAsp
6 2 1 2 2 4 2 2

```

5' TCA GAAATGGAACATACACATGA 3'
   T   G       G   C   T   C
   C               C
   G               G
AGT
C

```

Gegenstrang:

```

3' AGT CTTTACCTTGTATGAGTACT 5'
   A   C       C   G   T   G
   G               G
   C               C
TCA
G

```

Folgende vier Oligonukleotide wurden synthetisiert:

15A: 5' GTATGTTCCATTTCA 3' $T_H=43^\circ\text{C}$
 G C C

15B: 5' GTATGTTCCATTTCG 3' $T_H=45^\circ\text{C}$
 G C C

20A: 5' TCATGTGTATGTTCCATTTTC 3' $T_H=59^{\circ}\text{C}$
 G C G C C

20B: 5' TCATGAGTATGTTCCATTTTC 3' $T_H=59^{\circ}\text{C}$
 G G G C C

Halobakterielle Gesamt-RNA wurde mit diesen vier Oligonukleotiden als 'primer' revers transkribiert. Die Hybridisierungsbedingungen beim 'annealing' wurden entsprechend der Länge der Oligonukleotide gewählt. Die Formel für die DNA/DNA Hybridisierungstemperatur (T_H) (für jedes G/C Paar 4°C , für jedes A/T Paar 2°C und für Entartung 3°C) wurde als Anhaltspunkt für die Hybridisierung genommen (siehe 3.11.1).

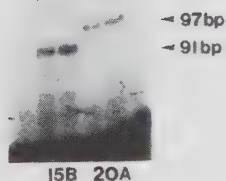


Abb.17. cDNA Synthese an halobakterieller Gesamt-RNA unter Verwendung der Oligonukleotide 15B und 20A als 'primer'. Die reverse Transkription wurde bei 30°C durchgeführt. Das cDNA Hauptprodukt mit 15B als 'primer' hat eine Länge von 91bp, das mit 20A als 'primer' ist 97bp lang.

Die enzymatische Reaktion wurde bei 30°C durchgeführt. Wie Abb.17 zeigt, entstanden die beiden Haupttranskripte mit 15B und 20A als 'primer'. Die Länge der beiden cDNAs beträgt 91bp bzw. 97bp und entspricht damit der 6bp-Verlängerung des

20mers (20A) gegenüber dem 15mer (15B) am 5'Ende. Mögliche Gründe für die Nebenbanden sind Heterogenität der RNA und/oder RNA-Sekundärstrukturen. Mit 20B wurde keinerlei Transkript und mit 15A eines bei 190bp und mehrere Nebenbanden beobachtet. Das Bandenmuster der 15A-Transkripte ist jedoch von dem mit 15B und 20A völlig verschieden und läßt auf eine unspezifische Hybridisierung an einer Stelle der Gesamt-RNA schließen, die am 5'Ende mit 15A basenpaart. Dieser wahrscheinlich unspezifischen Basenpaarung wurde nicht näher nachgegangen. Der 6bp Längenunterschied der Hauptprodukte erscheint jedoch signifikant für spezifische Hybridisierung am Genlocus, weil 'priming' an zwei verschiedenen RNA-loci die Entstehung von Haupttranskripten mit 6bp Längenunterschied aus statistischen Gründen ausschließt. 'Priming' in beiden Fällen an der falschen Stelle sollte durch die angewandte Temperaturstringenz bei der Hybridisierung ausgeschlossen sein. Als Ergebnis der cDNA Synthesen leitet sich folgende 21bp Komplementärsequenz ab:

5' TCATGTGTATGTTCCATTTTCG 3'
 G C G C C

Bezogen auf den GC-Gehalt von Halobakterien (67%) lautete die vermutliche Sequenz des Genfragmentes:

(Ser)GluMetGluHisThrHisAspLeu

5' CGAGATGGAGCACACGCACGA 3'

4.4.2 Koloniehybridisierung

Mit Oligonukleotid 15B und 20A wurde über Koloniehybridisierung einer Cosmidbank (Andreas Blanck, Martinsried) des halobakteriellen Genoms versucht, das Gen zu finden. Die Cosmidbank wurde hergestellt durch Ligation des Sau3AI Partialverdaus von halobakterieller DNA mit BamHI geschnittenem pHC79 Vektor. Phagenverpackung, Transformation in den E.coli Stamm DH1 und anschließende Selektionierung durch Ampicillin.

Beim 'screening' der Bibliothek konnten jedoch unter unseren Bedingungen keine eindeutig reagierenden Kolonien identifiziert werden. Die Klone reagierten unspezifisch:

- 1) große Anzahl von Klonen, an die Radioaktivität bindet.
- 2) fehlende Reproduzierbarkeit der Bindung und
- 3) starker Untergrund.

Variation des Verhältnisses von ^{32}P -ATP (3uCi/pMol) und Oligonukleotid bei der Kinasierung von 5:1 (100pMol/20pMol) bis 1:5 (100pMol/500pMol) und Verwendung verschiedener Puffersysteme (SSPE und SET) brachten keine besseren Ergebnisse.

Es lassen sich folgende Gründe anführen, warum die Koloniehybridisierung trotz spezifischer 'primer'-Reaktion sehr unspezifisch war:

- 1) RNA-DNA Hybridisierung ist stärker als DNA-DNA Hybridisierung, wobei sich über die Spezifität der Hybridisierung keine Aussage machen läßt.
- 2) Die Neigung zur Ausbildung von Sekundärstrukturen bei einzelsträngiger RNA einerseits und denaturierter.

chromosomaler DNA in lysierten Zellen andererseits ist sicherlich sehr unterschiedlich, so daß sich daraus in der Zugänglichkeit von Oligonukleotiden zu bestimmten Sequenzen große Unterschiede ergeben dürften.

3) Bei Kolonien läßt sich unspezifische Adsorption der Oligonukleotide an Zellmaterial und Proteine nicht ausschließen und überdeckt damit möglicherweise die spezifische Hybridisierung.

Für das Enzymgen stand neben dem 15mer mit 8facher Entartung ein 20mer mit 32facher Entartung als 'probe' zur Verfügung. Für das Ferredoxingen ließen sich dagegen zwei 20mere (siehe unten) mit je 16facher Entartung ableiten. Daher wurde zunächst mit diesen beiden Oligonukleotiden versucht, die selben Kolonien wie oben auf das Ferredoxingen hin zu testen.

4.5 Oligonukleotide als 'probe' für das Ferredoxingen

Folgende Gründe sprechen für die Untersuchung des Ferredoxingens:

- 1) Es wurden neben tRNA Genen (60,61) und rRNA Genen (62,63,64,65,66) erst zwei halobakterielle Strukturgene *bop* (67) und *brp* (68) untersucht
- 2) Vergleich des Ferredoxingens mit *bop* Gen und anderen halobakteriellen Genen ('codon usage', Introns etc.)
- 3) Identifikation von regulatorischen Sequenzen (Promotoren, Terminatoren, Ribosomenbindungsstellen etc.)
- 4) Suche nach Gründen für die hohe Expression des

Ferredoxins (2% des Gesamtproteins)

5) Suche nach Ferredoxingenen in anderen Organismen mit Hilfe des halobakteriellen Gens als 'probe' und Vergleich der Gene

Aus der Aminosäuresequenz des Ferredoxins (7) lassen sich zwei 'gute' Oligonukleotide (Abb.18) ableiten. Sie stammen aus beiden Hälften des Proteins und decken damit den Großteil des Gens ab. Es sind zwei 20mere mit 16facher Entartung und sind damit um den Faktor 2 weniger entartet als die Oligonukleotide 20A und 20B (4.4.1).

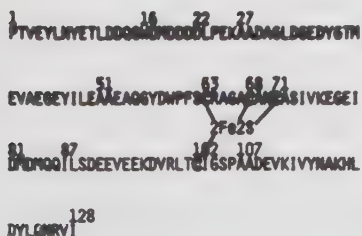


Abb.18. Aminosäuresequenz des Ferredoxins aus *Halobacterium halobium*. Die beiden Oligonukleotide 22 und 23 leiten sich von den Positionen 16-22 und 81-87 ab. Das Eisen-Schwefelzentrum wird ligandiert von den Cysteinen 63, 68, 71 und 102. Die drei Ala-Ala Stellen, die auf dem Gen drei Fnu4HI Restriktionsschnittstellen entsprechen, befinden sich an Position 27, 51 und 107.

Peptid 16-22: W D M D D D D

Genabschnitt 1: 5' TGGGATATGGATGATGATGA 3'
 C C C C

Oligonukleotid 22: 5' TCATCATCATCCATATCCCA 3'
(=Gegenstrang) G G G G

Theoret. Hybridisierungstemperatur: 60°C

Peptid 81-87: D M D M Q Q I

Genabschnitt 2: 5' GATATGGATATGCAACAAAT 3'
 C C G G

Oligonukleotid 23: 5' ATTTGTTGCATATCCATATC 3'
(=Gegenstrang) C C G G

Theoret. Hybridisierungstemperatur: 56°C

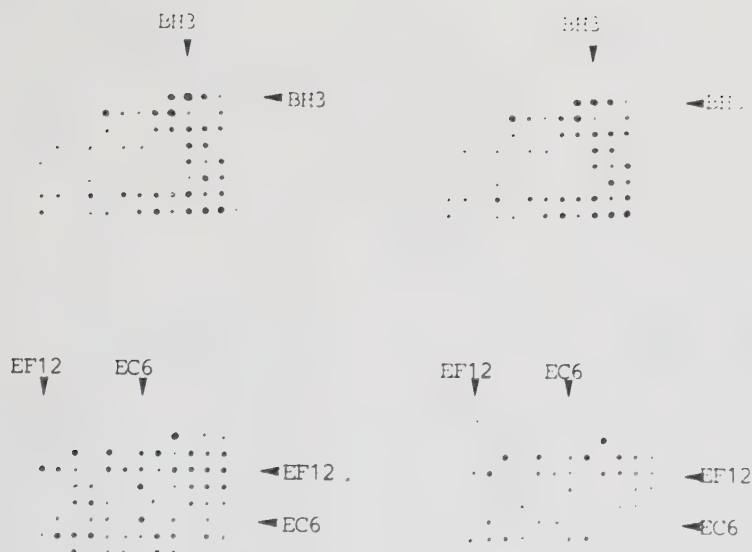


Abb.19. Koloniehybridisierung mit Oligonukleotid 22. Hybridisiert wurde 16h bei 50°C in 5xSSPE/ 0.3% SDS/ 100mg/l KalbsthymusDNA. Gezeigt ist das Autoradiogramm nach Waschen (30min in 1xSSPE/ 0.3% SDS und 30min in 1xSSPE) bei 50°C (linke Hälfte) und bei 65°C (rechte Hälfte). Positive Klone sind durch Pfeile gekennzeichnet. Nach dem 65°C-Waschvorgang wurde die Expositionszeit des Röntgenfilms auf das Dreifache verlängert.

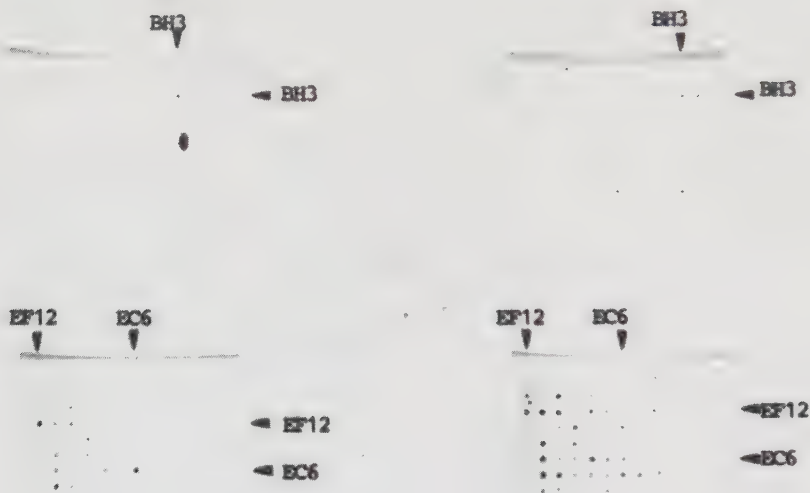


Abb.20. Koloniehybridisierung mit Oligonukleotid 23. Hybridisiert wurde 18h bei 46°C in 5xSSPE/ 0,3% SDS/ 100mg/l KalbsthymusDNA. Gezeigt ist das Autoradiogramm nach Waschen (30min in 1xSSPE/ 0,3% SDS und 30min in 1xSSPE) bei 50°C (linke Hälfte) und bei 60°C (rechte Hälfte). Positive Klone sind durch Pfeile gekennzeichnet. Nach dem 60°C-Waschvorgang wurde die Expositionszeit des Röntgenfilms auf das Fünffache verlängert.

4.5.1 Koloniehybridisierung

Abb.19 und Abb.20 zeigt das Ergebnis der Koloniehybridisierung mit Oligonukleotid 22 und 23 nach Waschen mit 1xSSPE unter und über der theoretischen Hybridisierungstemperatur. Identifiziert wurden die Klone durch die relative Abnahme der Filmschwärzung nach dem Waschen. Wie in Abb.19 und 20 zu sehen, war auch hier der unspezifische Untergrund z.T. stärker als die spezifische Hybridisierung. Drei Kolonien (BH3, EC6 und EF12) wurden als positiv beurteilt und weiter untersucht.

4.5.2 Doppelverdau der Cosmide und Hybridisierung

Nach Cosmidisolierung (150ug/2lKultur) wurde zuerst ein Restriktionsdoppelverdau durchgeführt. Die Länge des Ferredoxingens beträgt 384bp (=128 Aminosäuren). Restriktionserkennungssequenzen mit 6bp Länge sind statistisch alle 4096bp zu erwarten (bei 4 G/C-Paaren und 2 A/T Paaren trifft dieser Wert genau zu, weil Halobakterien auch 67% G/C besitzen). Zur ersten Restriktionsanalyse erschien ein Doppelverdau mit Restriktionsenzymen mit 6bp Erkennung sinnvoll, um Fragmente zu erhalten, die das Gen einschließlich Signalsequenzen enthielten. Es wurde in drei Ansätzen mit je zwei Enzymen geschnitten, die denselben Puffer benötigen und Stellen mit 4xG/C und 2xA/T schneiden. Folgende sechs Restriktionsenzyme wurden in die drei Doppelspaltungen eingesetzt:

'low buffer': KpnI: GGTAC/C
 SacI: GAGCT/C

'medium buffer': BamHI: G/GATCC
 PstI: CTGCA/G

'high buffer': SalI: G/TCGAC
 PvuI: CGAT/CG

Die Anzahl der gemeinsamen Fragmente >1kb in allen drei Spaltungen zusammen waren beim Vergleich von pABBH3 mit pABEF12 etwa doppelt so groß als beim Vergleich von pABBH3 mit pABEC6 und von pABEF12 mit pABEC6, wobei pABEF12 und pABEC6 noch mehr gemeinsame Fragmente haben als pABBH3 und pABEC6. Es wurde keine physikalische Feinkartierung durchgeführt. Aus der Anzahl der gemeinsamen Fragmente läßt sich lediglich ein grobes, qualitatives Überlappungsmuster (Abb.21) ableiten:

- 1) größte Überlappung zwischen pABBH3 und pABEF12
- 2) kleinste Überlappung zwischen pABBH3 und pABEC6
- 3) gemeinsame Überlappung >12kb

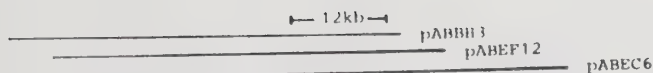


Abb.21. Einfaches, qualitatives Überlappungsmuster der Cosmide pABBH3, pABEC6 und pABEF12. Es wurde hergeleitet aus der Anzahl der gemeinsamen Fragmente >1kb, mit dem größten gemeinsamen Fragment von ca. 12kb nach KpnI/SacI Spaltung.

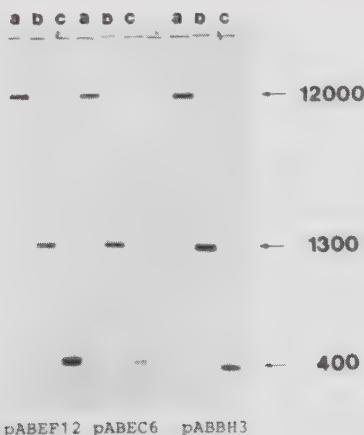


Abb.22. Hybridisierung von Oligonukleotid 22 gegen die auf Nitrocellulose transferierten Fragmente von pABBH3, pABEC6 und pABEF12 nach Restriktionsdoppelterverdau. Hybridisierungsbedingungen siehe Abb.20. Oligonukleotid 23 hybridisierte identisch.

a=KpnI/SacI, b=SalI/PvuI, c=PstI/BamHI

	22	23
KpnI/SacI	12000	12000
Sall/PvuI	1300	1300
PstI/BamHI	400	400

Tab.4. Zusammenfassung der Ferredoxin-spezifischen Hybridisierung der Oligomere 22 und 23 nach Restriktionsdoppelspaltung der pABBH3, pABEC6 und pABEF12 (Abb.22).

Abb.22 zeigt die Hybridisierung des Doppelverdaus mit den Oligonukleotiden 22 und 23 nach Transfer der Fragmente auf Nitrozellulose. Beide Oligonukleotide hybridisieren identisch (Tab.4). Es wurde bei 50°C (Oligo 22) bzw. 46°C (Oligo 23) inkubiert und bis 65°C bzw. 61°C gewaschen. Das hybridisierende 12kb Fragment nach KpnI/SacI Verdau ist zugleich das größte gemeinsame Fragment aller drei Cosmide.

4.5.3 Einzelverdau der Cosmide und Hybridisierung

Für den Einzelverdau wurden KpnI und SacI ausgeschlossen, weil das 12kb Fragment zur Sequenzierung des Ferredoxingens zu groß erschien. Es wurde mit SalI, PvuI, BamHI, PstI und Fnu4HI einzeln geschnitten. Fnu4HI erkennt GC/NGC. Da das Triplettcodon für Alanin GCN lautet und das Ferredoxin 3 Ala-Ala Stellen (Abb.18) enthält, sollte dieses Enzym mindestens dreimal im Gen schneiden, wobei ein 168bp Fragment (Ala51-Ala107) entstehen sollte. Dieses Fragment sollte mit Oligonukleotid 23, nicht aber mit Oligonukleotid 22 hybridisieren. Es würde sich ideal eignen als 'probe' für Ferredoxingene aus anderen Organismen, weil es alle vier Cysteine enthält, die das (2Fe-2S) Cluster ligandieren, und weil es den einen Überschuß an sauren Aminosäuren tragenden N-terminalen Schwanz, den nur halobakterielles Ferredoxin als Folge des hohen physiologischen Ionenmilieus benötigt, nicht enthält. Das Fragment, das mit Oligonukleotid 22 hybridisieren sollte, ließe sich für die Sequenzierung von Signalsequenzen stromaufwärts des Ferredoxingens verwenden.

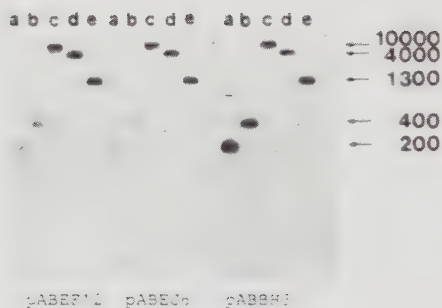


Abb.23. Hybridisierung von Oligonukleotid 22 gegen die auf Nitrocellulose transferierten Fragmente der Cosmidvektoren pABBH3, pABEC6 und pABEF12 nach Restriktionseinzolverdau. Hybridisierungsbedingungen siehe Abb.20. a=Fnu4HI, b=PstI, c=BamHI, d=PvuI, e=Sali

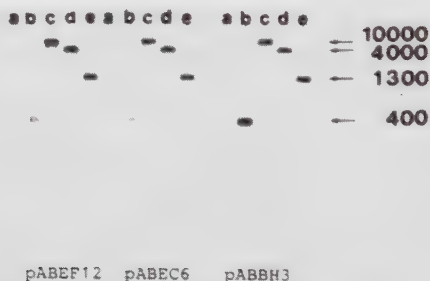


Abb.24. Hybridisierung von Oligonukleotid 23 gegen die auf Nitrozellulose transferierten Fragmente der Cosmidvektoren pABBH3, pABEC6 und pABEF12 nach Restriktionseinzolverdau. Hybridisierungsbedingungen siehe Abb.21. a=Fnu4HI, b=PstI, c=BamHI, d=PvuI, e=Sali

	22	23
BamHI	10000	10000
PvuI	4000	4000
SaII	1300	1300
PstI	400	400
Fnu4HI	200	-

Tab.5. Zusammenfassung der Ferredoxin-spezifischen Hybridisierung der Oligomere 22 und 23 nach Restriktionseinzelspaltung der Vektoren pABBH3, pABEC6 und pABEF12 (Abb.23 und 24).

Abb.23 und 24 zeigt die Hybridisierung des Einzelverdaus mit den Oligonukleotiden 22 und 23 nach Transfer der Fragmente auf Nitrozellulose, zusammengefaßt in Tab.5.

1) Das SaII/PvuI Fragment im Doppelverdau (Tab.4) ist reines SaII Fragment (Tab.5).

2) Das PstI/BamHI Fragment im Doppelverdau (Tab.4) ist reines PstI Fragment.

3) Zwischen bp46 (Aminosäure16) und bp261 (Aminosäure87) des Ferredoxingens befindet sich keine Schnittstelle für KpnI, SacI, BamHI, PvuI, SaII und PstI.

4) Oligonukleotid 22 hybridisiert mit einem Fragment (ca.200bp), welches 80bp des 5'Endes des Gens und ca. 120bp stromaufwärts des Strukturgens enthält. Oligonukleotid 23 hybridisiert überhaupt nicht. Das erwartete 166bp Fragment wird entweder nicht gebildet oder es hybridisiert aus

zunächst unbekanntem Grund (s.u.) nicht mit Oligonukleotid 23. Im Genabschnitt 2 (siehe oben), an den Oligomer 23 hybridisieren sollte, befindet sich das Pentanukleotid GCAGC oder GCAAC. Dies ergibt bei einem 'codon usage' für Glutamin von CAG eine GCNGC Schnittstelle für Fnu4HI und das Oligonukleotid 23 kann mit dem Gen an dieser Stelle nicht mehr hybridisieren. Dies wurde durch Sequenzierung des Gens bestätigt (Abb.25).

Die beiden Oligonukleotide 15B und 20A (siehe 4.4.1) hybridisierten nicht mit den Ferredoxin-spezifischen Fragmenten. Es ist daher auszuschließen, daß die Gene für die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und für das Ferredoxin im Genom benachbart auf einer einzigen Transkriptionseinheit liegen.

4.6 Das Ferredoxingen

4.6.1 Das Strukturgen

Das PstI Fragment und SalI Fragment wurden durch Elektroelution gewonnen und mit PstI bzw. SalI gespaltenem und dephosphoryliertem M13mp8 ligiert. Nach Transformation wurde aus willkürlich ausgewählten Rekombinanten (weiße 'plaques') Einzelstrang isoliert und sequenziert.

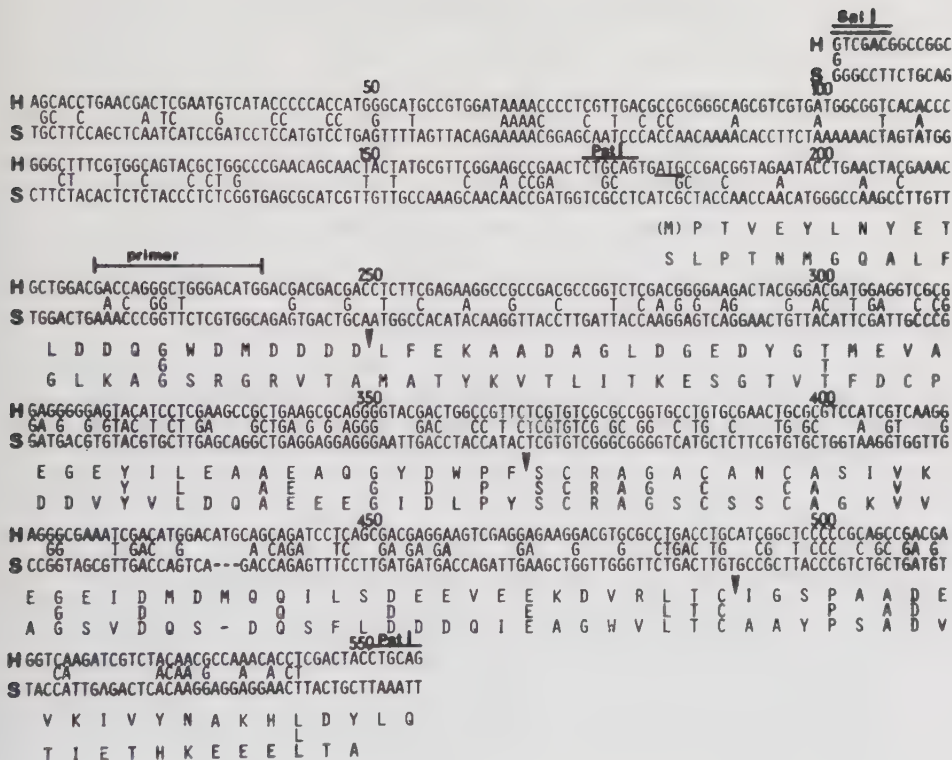


Abb.25. Vergleich der Aminosäure- und DNA-Sequenz der Ferredoxine aus der weißen Lichtnelke (*Silene pratensis*) (S) und *Halobacterium halobium* (H). Das 5'-Ende des SalI Fragmentes und die beiden Enden des PstI Fragmentes sind gekennzeichnet. Der 'primer' zur Sequenzierung der Region stromaufwärts des Strukturgens hybridisiert an Position 218-238bp. Die Pfeile markieren die Genabschnitte, die in Tab.6 verglichen werden.

Abschnitt auf SalI-Fragment	%Homologie auf Nukleotidsequenz	%Homologie auf Peptidsequenz
1-250bp	24	5
251-367bp	47	21
368-489bp	45	41
489-556bp	34	19
182-556bp	38	24

Tab.6 Homologievergleich von ausgewählten Genabschnitten der Ferredoxine von *Halobacterium halobium* und *Silene pratensis*. Die verglichenen Sequenzen sind in Abb.25 durch Pfeile gekennzeichnet.

Für die Sequenzierung des PstI Fragments wurde der handelsübliche 17mer 'primer' (5'GTAAACGACGGCCAGT3') für M13-Sequenzierung verwendet. Die Länge des PstI Fragmentes beträgt 377bp und umfaßt den Bereich von Position -11 (PstI Schnittstelle von -11 bis -6) bis Position 372 (PstI Schnittstelle von 367 bis 372) des Strukturgens. Das Dipeptid Leu-Glu entspricht der PstI Erkennungsstelle (CTGCAG). Durch Sequenzierung von M13mp8 mit dem (+)Strang-Insert wurde das 3'Ende und von M13mp8 mit dem (-)Strang-Insert das 5'Ende des Fragmentes sequenziert. Das Fragment enthält das Strukturgen mit Ausnahme der letzten 12 Basenpaare am 3'Ende (Asp-Arg-Val-Ile).

4.6.2 Die Promoterregion

Zur Sequenzierung der Region stromaufwärts des Strukturgens wurde ein synthetisches 21mer Oligonukleotid (5'CATGTCCCAGC-CCTGGTCGTC3') verwendet, das an Position 218-238bp des Sall Fragmentes hybridisiert (5'GACGACCAGGGCTGGGACATG3'). Das Sall Fragment enthält am 5'-Ende 184bp bis zum Beginn des Strukturgens. Der GC-Gehalt der 'upstream'-Region des Strukturgens ist mit 60% geringer als der des Strukturgens (64%) und des 'GC-reichen' Teils (69) des Genoms (67%). Man kann sie schon fast zum 'AT-reichen' (GC-Gehalt von 58%) Teil des Halobakteriengenoms rechnen (69). Die ersten 40bp vor dem Startcodon ATG haben einen AT-Gehalt von 50%.

Der Beginn der mRNA wurde nicht experimentell bestimmt. Bei der Suche nach möglichen Promotoren konnten weder typische eukaryontische (TATA-Box oder CAAT-Box) noch prokaryontische (Pribnow-Schaller-Box) Sequenzen gefunden werden, deren Einfluß auf die Transkriptionsrate nachgewiesen ist. Als charakteristische prokaryontische Signalsequenzen sind neben der sog. Pribnow-Schaller-Box (TATAAT) die beiden Regionen "-35" (TTGaca) und "-43" (AT-reich) konserviert. An Position -106 bis -101 (TTGAC) und -119 bis -114 (ATAAAA) lassen sich zwei ähnliche Bereiche erkennen. Kurze, reine AT-Regionen wie oben aufgeführt (ATAAAA) finden sich auch im *bop* (Bakterioopsin) -Gen (68) (-71 bis -67: TAAATT), im *brp* ('Bakterioopsin related protein') -Gen (68) (-74 bis -66: TTAAATATT) und im *hop* (Haloopsin) -Gen (Andreas Blanck, persönliche Mitteilung) (-64 bis -56: TTATTTAAT).

Die 3'-terminale Region der 16S rRNA ist bei *E.coli*

(-GAUCACCUCCUUA 3') und *H. halobium* (-GAUCACCUCCU 3') nahezu identisch (70). Als Ribosomenbindungsstelle der mRNA bei Prokaryonten ('Shine-Dalgarno-Sequenz') gilt die Konsensussequenz GGAGG(UG). Im *bop*-Gen (AGGT) (68), im *brp*-Gen (GGAG) (68) und im *hop*-Gen (GGTG) (Andreas Blanck, persönliche Mitteilung) finden sich potentielle Ribosomenbindungsstellen. Die Shine-Dalgarno-Sequenz wurde im Ferredoxingen nicht gefunden. Direkt am Startcodon ATG befindet sich die Pentanukleotidsequenz 5'GTGAT3' (-3 bis +2), die komplementär ist zum Pentanukleotid 5'AUCAC3', das sich 7bp vom 3'-Ende der 16S ribosomalen RNA entfernt befindet (siehe oben). Diese Stelle kann als mögliche ribosomale Bindungsstelle betrachtet werden.

4.6.3 Vergleich mit pflanzlichem Ferredoxingen

Abb.25 zeigt den Vergleich der halobakteriellen Ferredoxinsequenz mit der Gensequenz des Ferredoxins der weißen Lichtnelke (71) (*Silene pratensis*). Wie in Tab.6 zusammengefaßt, lassen sich deutlich homologe Bereiche, die im wesentlichen die FeS Zentrum bindende, Cystein enthaltende Kernregion umfassen, von den Genabschnitten, deren Homologie statistisch ist, unterscheiden. Die Homologie des gesamten Ferredoxin-Strukturgens mit dem pflanzlichen Ferredoxingen beträgt auf Proteinebene 24% und auf Genebene 38%.

4.6.4 'Codon usage'

Abb.26 zeigt den 'codon usage' des halobakteriellen Ferredoxingens (H) (mit Ausnahme der letzten 12bp), des Bacteriorhodopsingens (B) und des pflanzlichen Ferredoxingens (P). Der GC-Gehalt dieser drei Gene beträgt 64% (H), 62% (B) und 53% (P). Der Vergleich der beiden halobakteriellen Gene zeigt kaum Unterschiede. Die Hauptabweichung findet sich bei Valin und Alanin. Der Vergleich der beiden Ferredoxingene zeigt signifikante Unterschiede beim Gebrauch der tRNAs. Bei Isoleucin, Valin, Serin und Threonin finden sich die deutlichsten Abweichungen. Für Tyrosin, Histidin und Asparagin wird das selbe Triplettkodon benutzt. Es fällt auf, daß im Falle des halobakteriellen Ferredoxingens an der 'wobble'-Position (dritte Base im Triplettkodon) sehr selten A oder T steht (einzige Ausnahme: Glutaminsäure mit 7xA).

B H P				B H P				B H P				B H P			
TTT	F	1		TCT	S	5		TAT	Y	3		TGT	C	1 3	
TTC		13 2 2		TCC		3 2		TAC		8 7 4		TGC		3 2	
TTA	L	2		TCA		4		TAA	-			TGA	-		
TTG		6 4		TCG		5 2 5		TAG		-		TGG		W 8 2 1	
CTT	L	2 3		CCT	P			CAT	H			CGT	R	3 1	
CTC		12 5 2		CCC		3 1		CAC		1 1		CGC		3 2	
CTA		2 2		CCA		3 3		CAA	3		CGA				
CTG		15 4 2		CCG		6 2 3		CAG	4 5 4		CGG	1 1			
ATT	I	4		ACT	T	5		AAT	N			AGT	S	1 1	
ATC		15 6		ACC		7 1 5		AAC		3 3 1		AGC		5 1 2	
ATA	M			ACA		3		AAA	K	3 1 1		AGA	R	1	
ATG		10 4 4		ACG		10 3		AAG		4 4 5		AGG			
GTT	V	3 6		GCT	A	1 1 7		GAT	D	2 5		GGT	G	4 2 4	
GTC		8 5 1		GCC		8 8 5		GAC		816 6		GGC		10 3 1	
GTA		3 1		GCA		5 1 2		GAA	4 7 2		GGA	4 3			
GTG		9 1 5		GCG		16 4 2		GAG	7 9 7		GGG	8 4 2			

Abb.26. Vergleich des 'Codon usage' der Gene des Bacterioopsins (B), des halobakteriellen Ferredoxins (H) und des pflanzlichen Ferredoxins aus *Silene pratensis* (P). Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben.

4.7 4Fe-4S Ferredoxine bei Archae- und Eubakterien

'Bakterientyp' Ferredoxine zeichnen sich aus durch charakteristische Anhaufung der Cluster bindenden Cysteine: CysxxxCysxxxCysxxxCys. Sie bestehen aus zwei analogen Domänen (Abb.27), das Resultat einer frühen Genduplikation. Es wurde ein Computer-Sequenzvergleich von 3 archaebakteriellen und 8 eubakteriellen Ferredoxinen durchgeführt. Die verwendeten archaebakteriellen Ferredoxine umfassen alle bekannten Sequenzen und die eubakteriellen Ferredoxine wurden ausgewählt als repräsentativ für den jeweiligen phylogenetischen Stamm.

Ta	53-LGIHGTHVAVDWDCCADGACADVC	PNVLYEWNLPKSGTG	KCDPVRESDCIFAC	ESVCPVRAIKITP
Sa	30-LGVHGTIVGVDFDLCAIDGSCITAC	PNVNVFQWYETPGHPASEKKADPVHQA	CIFAC	ACVCPVAAIDVKPP
Ab	PATVNADECSGGTGVDECPNDAILDE		EKGIAVVDNDECEGAC	EEACPNQAIKVEE
Tt	PHVICQPCIGV	KDQS	CEVECPVECIYDGG	DQFYIHPEECIDGACVPAC
Ms	TYVIAEPCVDV	KDKA	CIEECPVDCIYEGA	RILYIHPDECDGAC
Av	AFVVTDNCKIC	KYTD	CEVECPVDCFYEGP	NFLVIHPDECIDGAC
Cd	AYKIADSCVSCGACASECPVNAISQGD		SIFVIDADTCIDCGN	ANVCPVGAPVQE
Chv	ALHITDCCINNVCOECPNGAISQGD		ETVYIEPSLCTEC	VEVECPVDCIKDP-20
ChI	ALYITEECTYCGACEPCPYTAISAGD		DIYVIDANTCNEC	AVAVCPAECIVQG
Bs	PKYITVDKETIACGACGAAPDIYDYDENGIAVYTLN		GGIVEVPDILID	YDAFECPTESIKVADE-10
Da	PIEVNDNACEAEVEICPDVFEMNEEG		DKAVINPDSLDLCE	VAIOSCPAEAIRS

Abb.27. Vergleich der 11 durch Computeranalyse untersuchten Ferredoxine. Die Cysteine sind hervorgehoben. Abkürzungen für die Organismen siehe Text bzw. Abkürzungsverzeichnis.

Die Ferredoxine von *Thermoplasma acidophilum* (Ta) (13) und *Sulfolobus acidocaldarius* (Sa) (14) besitzen je ein (4Fe-4S) Cluster und ein (3Fe-3S) Cluster (R.Cammack, London, persönliche Mitteilung) und sind Elektronenakzeptoren der 2-Oxosaure-Ferredoxin-Oxidoreduktasen. Das Ferredoxin von *Methanosarcina barkeri* (Mb) (72,73) hat ein (3Fe-3S) Zentrum und ist wahrscheinlich Elektronendonator bei der Methanbildung aus Methanol. Seine Akzeptorfunktion wurde noch nicht genau untersucht.

Das Eubakterienreich wird nach einer umfassenden 16S-RNA Analyse (S_{AB} -Werte) eingeteilt in 10 Divisionen (74). Aus vier dieser Divisionen sind Sequenzen von Ferredoxinen bekannt.

a) Grampositive Bakterien

Das *Bacillus stearothermophilus* Ferredoxin (Bs) (75) besitzt ein (4Fe-4S) Zentrum, das *Clostridium pasteurianum* Ferredoxin (Cp) (76) zwei (4Fe-4S) Zentren (es gilt als der Prototyp für Ferredoxine vom 'Bakterientyp') und das *Mycobacterium smegmatis* Ferredoxin (Ms) ein (4Fe-4S) und ein (3Fe-3S) Cluster (77,78,79,80).

b) Purpurbakterien und Verwandte

Das *Azotobacter vinelandii* Ferredoxin (Av) (81) hat ein (4Fe-4S) und ein (3Fe-3S) Cluster und das *Chromatium vinosum* Ferredoxin (Chv) (82) zwei (4Fe-4S) Cluster. Das *Desulfovibrio gigas* Ferredoxin (Dg) (83) ist je nach physiologischer Funktion interkonvertierbar zwischen einem Trimer mit 3(4Fe-4S) Zentren und einem Tetramer mit 4(3Fe-3S) Zentren (84,85,86,87).

c) Grüne Schwefelbakterien

Das *Chlorobium limicola* Ferredoxin (Chl) (88) gleicht in Struktur und seiner Funktion als Photosynthesekomponente dem *Chromatium vinosum* Ferredoxin (siehe b).

d) Strahlungsresistente Mikrokokken

Das *Thermus thermophilus* Ferredoxin (Tt) (78,89,90) (Klassifikation nach E. Stackebrandt, persönliche Mitteilung) besitzt ein (4Fe-4S) und ein (3Fe-3S) Cluster. Abb.28 zeigt die Sequenzen der 11 Ferredoxine. Dabei zeigen sich folgende Charakteristika:

Ta und Sa haben einen langen N-terminalen Schwanz, ungewöhnliche Cysteinanordnung in der ersten Domäne und Insertion zwischen den Domänen. Mb hat eine Cysteinanordnung wie Cp, dessen zwei tetranukleäre Cluster sich artifiziell durch Oxidation mit Hexacyanoferrat in ein trinukleäres Cluster, wie es Mb besitzt, umwandeln lassen (91). Tt, Ms und Av zeigen eine Insertion innerhalb der ersten Domäne und eine Verlängerung am C-Terminus. Cp ist der Prototyp der (4Fe-4S) Ferredoxine. Die beiden Ferredoxine aus photosynthetischen Organismen Chv und Chl haben in der zweiten Domäne eine charakteristische Insertion. Chv ist am C-terminalen Ende verlängert. Die Tatsache, daß die zweite Domäne von Chv und Chl mit der ersten Domäne von Tt, Ms und Av im Bezug auf Cysteinanordnung und Aminosäuresequenz auffallende Homologien zeigt, erinnert an Sequenzinversion (92). Bs hat nur vier Cysteine (Verlust eines Clusters), eine Insertion zwischen den Domänen und eine C-terminale Verlängerung. Bei Dg sind in der zweiten Domäne zwei

Cysteine mutiert.

	Ta	Sa	Mb	Tt	Ms	Av	Cp	Chv	Chl	Bs	Dg
Ta		22,0	6,7	4,4	4,6	2,4	5,9	0,9	2,2	1,0	3,3
Sa			8,2	4,7	4,5	4,2	7,4	4,6	4,4	3,8	4,8
Mb				8,1	7,1	8,7	11,0	7,1	7,7	7,8	6,9
Tt					21,7	16,4	9,9	6,3	4,1	2,3	4,8
Ms						19,2	11,4	5,3	5,1	3,6	3,3
Av							11,0	6,1	5,8	4,8	6,2
Cp								13,4	13,7	4,9	5,6
Chv									15,4	3,1	5,6
Chl										3,6	4,1
Bs											10,5
Dg											

Abb.28. Computervergleich der 11 Ferredoxine vom 'bakteriellen Typ' mit Hilfe des Programms ALIGN. Angegeben sind SD-Werte, dh. die Anzahl der Standardabweichungen bei Vergleich der gegebenen Sequenzen relativ zur Homologie der realen Sequenzen mit Zufallssequenzen derselben Aminosäurezusammensetzung. Abkürzungen siehe Text bzw. Abkürzungsverzeichnis.

	Ta	Sa	Mb	Tt	Ms	Av	Cp	Chv	Chl	Bs	Dg
Ta		15,1	7,8	5,5	8,2	6,6	6,8	3,5	3,3	1,9	2,2
Sa			8,8	6,3	7,5	7,4	8,6	4,2	4,9	2,5	3,9
Mb				10,1	10,8	10,4	9,2	8,6	6,3	6,5	5,6
Tt					16,7	16,2	9,8	8,3	10,2	7,5	4,3
Ms						18,0	10,0	8,1	9,5	6,9	4,7
Av							9,8	10,6	8,3	7,2	4,7
Cp								10,5	11,7	6,0	4,9
Chv									12,3	2,6	4,5
Chl										3,7	3,0
Bs											8,8
Dg											

Abb.29. Computervergleich der 11 Ferredoxine vom 'bakteriellen Typ' mit Hilfe des Programms RELATE. Angegeben sind SD-Werte, dh. die Anzahl der Standardabweichungen bei Vergleich der gegebenen Sequenzen relativ zur Homologie der realen Sequenzen mit Zufallssequenzen derselben Aminosäurezusammensetzung. Abkürzungen siehe Text bzw. Abkürzungsverzeichnis.

Abb.28 und 29 zeigen den Sequenzvergleich der 11 Ferredoxine mit Hilfe der Computerprogramme ALIGN und RELATE.

Generell ist ALIGN besser geeignet zum Vergleich von Sequenzen anlicher Länge (Ta/Sa,Chl/Chv/Cp und Ms/Tt) ohne größere interne Repititionen oder Rearrangements und ohne längere Deletionen oder Insertionen. Dagegen ist RELATE besser geeignet zum Auffinden von internen Sequenzhomologien (Duplikationen oder Replikationen), zum Vergleich von Sequenzen unterschiedlicher Länge (Chv/Ta, Mb/Av, Mb/Tt und Mb/Ms) und bei Auftreten von verwandten Sequenzen, die nicht kolinear angeordnet sind, sondern in unterschiedlicher Reihenfolge aufeinanderfolgen (Chv und Chl / Tt und Ms und Av). RELATE eignet sich auch, eine Sequenz "mit sich selbst" zu vergleichen, um interne Sequenzhomologien herauszufinden. Ausgehend von RELATE wurde ein Stammbaum der Ferredoxinsequenzen konstruiert (Abb.30). Die senkrechten Linien (Verzweigungspunkte) errechnen sich aus dem Durchschnitt aller SD-Werte, die vom Verzweigungspunkt ausgehen. Bei der Konstruktion wird von den höchsten SD-Werten ausgegangen und sukzessive die nächst niedrigeren SD-Werte mit einbezogen. Der Stammbaum führt zu folgendem Ergebnis:

1) Die Genduplikation hat stattgefunden vor der Diversifikation in die beiden bakteriellen Urreiche. Ta und Sa haben sich wegen Adaption an thermoacidophile Lebensbedingungen von anderen Ferredoxinen evolutiv entfernt. Tt, Ms und Av zeigen die gleiche Cluster-Zusammensetzung. Mb hat große Homologien zu diesen drei Ferredoxinen, wobei seine Homologie zu Ta und Sa von allen Ferredoxinen am größten

ist. Die beiden photosynthetischen Ferredoxine zeigen große Verwandtschaft. Bs und Dg sind das Resultat der Anpassung an spezifische physiologische Bedingungen, die sich widerspiegelt in ihrer ungewöhnlichen Cluster-Zusammensetzung.

2) Beispiele für konvergente Evolution:

Chlorobium und *Chromatium* haben phylogenetisch keine Verwandtschaft. *Thermus*, *Mycobacterium* und *Azotobacter* sind phylogenetisch nicht verwandt.

3) Beispiele für divergente Evolution:

Bacillus und *Clostridium* sind verwandt. Bs hat 4 Cysteine und damit nur ein Eisen-Schwefel Zentrum. Das zweite Cluster ging im Verlaufe der Evolution verloren, während Cp die ursprüngliche Struktur konservierte. *Azotobacter*, *Chromatium* und *Desulfovibrio* sind verwandt. *Desulfovibrio* gehört zur "photosynthetischen Linie", hat aber die Fähigkeit zur Photosynthese verloren, wobei sich Dv an seine Funktion als Elektronenakzeptor der phosphoroklastischen Reaktion und als Elektronendonator bei der Sulfitreduktion angepaßt hat. Bei *Azotobacter*, das vom selben photosynthetischen Vorgänger abstammt, ist die Funktion von Av im Nitrogenase-System wahrscheinlich, aber nicht nachgewiesen.

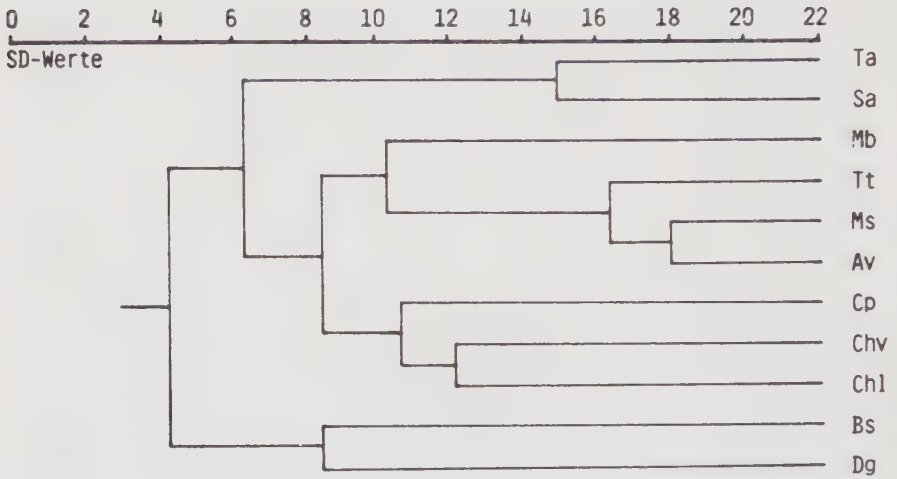


Abb.30. Stammbaum der Ferredoxinsequenzen basierend auf der Computeranalyse RELATE. Bei der Konstruktion geht man von den höchsten SD-Werten aus und schließt sukzessive die nächst kleineren Werte mit ein. Die senkrechten Linien sind das arithmetische Mittel aller SD-Werte, die von dem jeweiligen Verzweigungspunkt ausgehen (siehe Abb.30). Abkürzungen siehe Text bzw. Abkürzungsverzeichnis.

5. Diskussion

5.1 Zur Antigenizität der Oxidoreduktasen

Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und die 2-Oxoglutarat-Ferredoxin Oxidoreduktase aus *Halobacterium halobium* zeigen große chemische und strukturelle Verwandtschaft (9,10). Ihre Molekulargewichte und ihre Aminosäurezusammensetzung sind sehr ähnlich. Ihr Coenzymgehalt, ihre Untereinheitenstruktur und ihre FeS Zentren sind gleich. Die 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase wird bei der Aussalzungschromatographie früher als die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase eluiert. Die Effekte, die bei der Aussalzungschromatographie für die Proteintrennung verantwortlich sind, sind nicht genau bekannt. Es könnten leichte Konformations-, Ladungs- oder Hydrophobizitätsunterschiede auf der Moleküloberfläche sein. Bei der Hydroxylapatitchromatographie wird die 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase länger auf der Säule festgehalten als die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase. Die Elutionspunkte beider Enzyme unterscheiden sich um ca. 80mM Phosphat. Der Grund für die längere Retention der 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase könnte eine größere Anzahl von negativen Ladungen (saure Aminosäuren) auf der Moleküloberfläche sein, die mit den Calciumkationen des Säulenmaterials wechselwirken. Das Ausmaß von Sulfatierung oder Phosphorylierung von Aminosäureresten wurde nicht

untersucht. Diese Art der Derivatisierung wurde bei der Hydroxylapatitchromatographie noch stärker das Laufverhalten beeinflussen als einfach negativ geladene Aminosaurereste, deren Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial in Anwesenheit von 3M KCl abgeschwächt ist.

Die grundsätzliche chemische und strukturelle Übereinstimmung wurde durch die 'Westernblot' Analyse bestätigt. Polyklonale Antikörper gegen die große Untereinheit (A α) und gegen die kleine Untereinheit (A β) der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase reagieren mit gleicher Spezifität aber unterschiedlicher Intensität mit der 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase. Die kleinen Untereinheiten beider Enzyme reagieren mit A β nahezu identisch (die schwache Reaktion der großen Untereinheit der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase mit A β ist nicht signifikant).

A α reagiert mit beiden Enzymen weniger spezifisch, mehrere Banden werden sichtbar. Dabei reagiert die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase wesentlich stärker mit A α als die 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, wobei das Bandenmuster sehr ähnlich ist. Dafür, daß mehrere Banden reagieren, gibt es zwei Gründe. Entweder war das Enzym nicht ganz sauber und enthielt stark antigene NebenkompONENTEN oder die große Untereinheit ist proteolyseanfällig, wobei die Proteolyseprodukte wiederum stärker antigen sein können als die intakte Untereinheit. Die relativ starke Intensität der Nebenbanden im Fluoreszenzmuster könnte auch eine Folge davon sein, daß sich die Fluoreszenzemission der Hauptbande bereits im Sättigungsbereich befindet und daher die

Nebenbanden relativ starker erscheinen als die Hauptbande (große Untereinheit). Das Experiment zeigt, daß die kleinen Untereinheiten beider Enzyme einander ähnlicher sind als die großen Untereinheiten. Über die Funktion der beiden Untereinheiten ist wenig bekannt.

Auf der großen Untereinheit ist zumindest ein Teil des katalytischen Zentrums, wie es die Lokalisation des FeS Zentrums beweist (siehe unten). Wenn das katalytische Zentrum vollständig auf der großen Untereinheit liegt, dann sollte seine Geometrie erlauben, daß die 2-Oxosäure, Thiamindiphosphat, das FeS Zentrum und CoASH in so engen Kontakt mit einander kommen, daß ein koordinierter Ablauf der Reaktion möglich ist: Bindung der 2-Oxosäure an Thiamindiphosphat und Abgabe des ersten Elektrons, Acetylierung des CoA und Abgabe des zweiten Elektrons. Die Elektronenübertragung von Substrat auf das FeS Zentrum des Enzyms und von dort auf Ferredoxin könnte auf direktem Weg oder über Aminosäureseitenketten erfolgen, so daß sich über die Distanzen bei der Elektronenübertragung keine Aussage machen läßt.

Über die Funktion der kleinen Untereinheit ist nichts bekannt. Sie könnte das Ferredoxin binden oder am katalytischen Reaktionszentrum beteiligt sein (Katalysezentrum zwischen großer und kleiner Untereinheit). Die unterschiedliche Substratspezifität bei beiden Enzymen bedingt zumindest strukturelle Unterschiede an der Bindungsstelle der 2-Oxosäure. Dabei decarboxyliert die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase auch 2-Oxoglutarat,

während die 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase Pyruvat nicht umsetzt. Für die unterschiedliche Intensität der Kreuzreaktion der großen Untereinheiten sollten Sequenzunterschiede (s.u.) verantwortlich sein. Die Molekulargewichte der großen Untereinheiten (88000 Da bei der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und 86000 Da bei der 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase) sind einander sogar ähnlicher als die der beiden kleinen Untereinheiten (36000 Da im Fall der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und 42000 Da im Fall der 2-Oxoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase).

Antikörper gegen die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase sollten auf alle Fälle rein sequenzspezifisch und nicht konformationsspezifisch sein, weil das Enzym (nur in 3M KCl stabil und aktiv) sowohl im Kaninchenblut wie im SDS-Gel und auf der Nitrozellulose im denaturierten Zustand vorliegen sollte. Wenn man annimmt, daß bei der Antikörperbildung im Blut die gesamte Sequenz der jeweiligen Untereinheit gleichmäßig zugänglich ist, dann zeigt die vorliegende immunologische Analyse, daß die beiden kleinen Untereinheiten größere Sequenzhomologien aufweisen als die beiden großen Untereinheiten.

5.2 Zum FeS Zentrum des Enzyms

Das Eisen-Schwefel Zentrum wurde auf der großen Untereinheit lokalisiert. Das Ergebnis der Isolierung der Cysteinpeptide war unerwartet. Das Hauptprodukt bei der Isolierung der Cysteinpeptide zeigt Homologie mit der Fe-bindenden

Peptidsequenz eines völlig anderen Enzyms, der Nitrogenase Reduktase. Die Peptidstruktur in der Nitrogenase Reduktase, an der ein $4\text{Fe}4\text{S}$ Cluster hängt, unterscheidet sich von der Peptidsequenz (Cys x x Cys x x Cys x x x CysPro), die aus $4\text{Fe}4\text{S}$ Ferredoxinen bekannt ist. In der Nitrogenase Reduktase überbrückt das FeS Zentrum zwei identische Untereinheiten. Dieses charakteristische Cysteinmuster von $4\text{Fe}4\text{S}$ Ferredoxinen wurde auch bei der Sequenzierung der Cluster-bindenden Peptide der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase nicht gefunden.

Das FeS Zentrum der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase könnte also in ähnlicher Weise wie bei der Nitrogenase Reduktase zwei Domänen der großen Untereinheit miteinander verbinden.

5.3 Zur Evolution der $4\text{Fe}4\text{S}$ Ferredoxine

Ferredoxine werden zu den ältesten Proteinen überhaupt gezählt. Eisensalze und Sulfide waren im anoxischen Milieu zu Beginn der Evolution von Lebewesen sicherlich verbreitete anorganische Komponenten der 'Ursuppe'. Ungeachtet dessen, wie die ersten Peptide entstanden sind (durch Katalyse an Aluminiumsilikaten, in Koazervattropfen oder Mikrosphären), kann man sich die spontane Bildung von Komplexen aus Polypeptidketten, Eisen und Schwefel leicht vorstellen (93). Es ist bekannt, daß unter Sauerstoffausschluß aus Apoferredoxinen bei Zugabe von Fe^{2+} und S^{2-} voll funktionsfähige Ferredoxine entstehen. Sie waren sicher geeignet als erste 'primitive' Katalysatoren in Redoxreak-

tionen. Alle bekannten 4Fe4S Ferredoxine scheinen aus dem selben 'Urferredoxin' entstanden zu sein. Dies wird bestätigt durch die vorliegende Vergleichsanalyse. Durch frühe Genduplikation sind zwei Proteindomänen entstanden (sie müssen für die Funktionsfähigkeit der Ferredoxine nicht notwendigerweise kovalent mit einander verbunden sein). Diese Proteine haben sich durch Variation dieses Grundgerüsts an ihre funktionellen Bedingungen angepasst. Es ist erstaunlich, daß sich die Ferredoxine bei *Thermoplasma* und *Sulfolobus* einerseits und *Halobacterium* andererseits bei identischer Funktion strukturell stark unterscheiden. Bei allen vier Archaeobakterien (der vierte untersuchte Organismus ist *Desulfurococcus*) ist der Enzymtyp der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase nachgewiesen worden. Der Nachweis basiert auf der Bildung eines ESR-Signals bei $q=2,01$ (siehe Einleitung) bei Zugabe von Pyruvat und Verschwinden dieses Signals bei anschließender CoA Zugabe unter Bildung von AcetylCoA. Die Ferredoxine in Archaeobakterien sind Elektronenakzeptoren im 2-Oxosäure-Ferredoxin-Oxidoreduktase System (8). Die Ferredoxinsequenzen aus *Thermoplasma* und *Sulfolobus* zeigen große Homologie (13). Charakteristisch ist bei beiden ein langer N-terminaler Schwanz und ein Einschub zwischen den beiden Domänen. Über ihre strukturelle Ähnlichkeit können nur Röntgendaten nähere Auskunft geben, weil das *Thermoplasma* Ferredoxin zwei zusätzliche Cysteine enthält, die an der Bindung des Eisen-Schwefel Zentrums beteiligt sein könnten. Auf die Funktionen der acht eubakteriellen Ferredoxine soll nicht

näher eingegangen werden (Photosynthese, Sulfitreduktion, Stickstofffixierung, oxidative Decarboxylierung, phosphoroklastische Reaktion etc.).

Bei der Konstruktion des Stammbaumes wurden keine funktionellen Aspekte berücksichtigt. Das einzige Vergleichskriterium ist die Aminosäuresequenz. Der Stammbaum eignet sich damit nicht zur Untersuchung von phylogenetischen Verwandtschaften. Für diesen Zweck muß man Proteine oder Proteinkomplexe, die in allen Zellen vorkommen und identische Funktionen erfüllen (DNA Polymerasen, RNA Polymerasen, Ribosomen, Enzyme von universellen Stoffwechselwegen, ATPasen etc.), von universellen Zellkomponenten wie ribosomale RNAs oder von ganzen Stoffwechselwegen vergleichen. Ribosomale RNAs eignen sich deshalb ganz besonders für phylogenetische Betrachtungen, weil sie nicht in solchem Maß äußeren Selektionsdrücken ausgesetzt sind wie Proteinfunktionen. Sie dienen deshalb als 'gleichmäßig schnell laufende Evolutionsuhren'. Zur Untersuchung von phylogenetischen Verwandtschaften ist es notwendig, Stammbäume von unterschiedlichen Makromolekülen bestimmter Funktion (s.o.) in ihrer Eignung als konstante biologische Uhren zu bewerten und eine Art Mittelwert aus allen diesen Stammbäumen zu bilden.

Der vorgelegte Stammbaum (Abb.30) unterscheidet sich deshalb völlig vom 16S rRNA-Stammbaum (91), weil die Ferredoxine nach folgenden beiden Kriterien ausgewählt wurden: 1) Alle phylogenetischen Linien (nach 16S rRNA) sollten vertreten sein, soweit Sequenzen bekannt sind. 2) Bei homologen

Ferredoxinen aus nahe verwandten Organismen (nach 16S rRNA) wurde jeweils nur ein einziger Vertreter ausgewählt. Der Ferredoxinstammbaum ist deshalb nicht als phylogenetischer Stammbaum, sondern als Stammbaum von unterschiedlichen Proteinstrukturen (als Folge unterschiedlicher Funktionen) ein und desselben Proteins zu sehen. Der entscheidende Vorteil eines solchen Stammbaumes ist es, daß man konvergente und divergente Evolution von Proteinstrukturen betrachten kann:

- 1) große Homologie von Ferredoxinen identischer Funktion aus völlig unterschiedlichen phylogenetischen Linien: *Chromatium* und *Chlorobium* (konvergente Evolution)
- 2) große Homologie von Ferredoxinen ähnlicher Raumstruktur (gleiche FeS Zentren) aus völlig unterschiedlichen phylogenetischen Linien: *Thermus*, *Mycobacterium* und *Azotobacter*
- 3) geringe Homologie (unterschiedliche Funktion) von Ferredoxinen aus verwandten Spezies: a) *Bacillus*, *Clostridium* und *Mycobacterium* und b) *Azotobacter*, *Chromatium* und *Desulfovibrio*.

5.4 Zur Evolution des Enzymsystems

Aus den bisher bekannten Daten ist anzunehmen, daß die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase bei allen untersuchten Archaeobakterien ähnliche Struktur besitzt (gleicher katalytischer Mechanismus). Bei der Betrachtung der beteiligten Ferredoxine als Coenzyme bietet sich ein

konfuses Bild: 1) Die beiden Ferredoxine von *Thermoplasma* und *Sulfolobus* zeigen beträchtliche Sequenzhomologie. 2) Halobakterielles Ferredoxin zeigt keinerlei Homologie zu diesen beiden Ferredoxinen. Da beide Ferredoxintypen identische Funktion erfüllen, sollte man zumindest ähnliche Enzymbindungsstellen erwarten. 3) Ein ferredoxinfreier Rohextrakt von *Thermoplasma* katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat besser mit halobakteriellem Ferredoxin als Elektronenakzeptor als mit *Sulfolobus* Ferredoxin (8). Definitive Aussagen über die Geometrie der Enzym-Coenzym Wechselwirkung lassen sich nur mit Hilfe von Kristallstrukturdaten machen. Es bleibt die Frage nach dem Ursprung des $2\text{Fe}2\text{S}$ Ferredoxins in Halobakterien, Cyanobakterien und Chloroplasten. Chloroplasten gelten als Produkt der Endosymbiose eines Urkaryonten (kernloser und organellenloser Eukaryont) mit einem Cyanobakterium. Einer der größten Sprünge in der Evolution war sicher der Augenblick, in dem photosynthetische Bakterien vom photoorganotrophen bzw. photolithotrophen, anaeroben Wachstum dazu übergingen, mit Hilfe von Lichtenergie Wasser zu Sauerstoff zu oxidieren. Die Koordination der vor diesem Punkt getrennten Photosysteme I und II in getrennten phylogenetischen Linien phototropher Bakterien ist damit verknüpft. Die Frage, ob die Kombination der beiden Photosysteme die Wasseroxidation erst ermöglichte oder die Wasseroxidation die Kombination bewirkte, läßt sich nicht beantworten. Die Entstehung des Sauerstoffes (ob biogen oder abiogen) war im Grunde genommen eine Vergiftung damaligen

Lebens. Nach der Bildung von Enzymen zur Vernichtung von Folgeprodukten der Autoxidation (Katalase, Superoxiddismutase) müssen die ersten Atmungssysteme (sie haben sich möglicherweise aus einer photosynthetischen Elektronentransportkette entwickelt) entstanden sein, um sich den 'schadlichen' Sauerstoff zu Nutze zu machen. Cyanobakterien als erste physiologische Sauerstoffproduzenten waren wohl auch unter den Ersten, die die genetische Information für Sauerstoffverwertung bildeten. Atmung ist wahrscheinlich unter Sauerstoffselektionsdruck mehrmals gleichzeitig entstanden. Die Atmungskette hat sich entweder aus der photosynthetischen Elektronenübertragungskette entwickelt (Enterobakterien aus Purpurbakterien) oder sie ist in fermentativen Anaerobiern (*Bacillus* aus *Clostridium*) entstanden (horizontaler Gentransfer?). Die ersten Cyanobakterien hatten möglicherweise zwei Aufgaben gleichzeitig zu lösen: 1) Etablierung eines Photosyntheseapparates aus zwei Photosystemen und 2) Etablierung eines Atmungsapparates. Man kann annehmen, daß zu diesem Zeitpunkt der Entstehung (Atmung) und Umstrukturierung (Photosynthese) von zwei fundamentalen Energieumwandlungssystemen der Austausch von genetischer Information zwischen noch unvollkommen entwickelten Organismen auf Grund des Fehlens von strengen Speziessschranken möglich war. Die Kombination der beiden Photosysteme könnte die Folge einer solchen Genübertragung sein. Es bleibt festzuhalten, daß Gentransfer von photosynthetischen Bakterien untereinander und von diesen auf andere damaligen Organismen (z.B. Archaeobakte-

rien) grundsätzlich möglich erscheint.

Halobakterien bilden zusammen mit Methanogenen eine der beiden archaebakteriellen Hauptzweige (16S rRNA - S_{AB} Werte). Stoffwechsel und Art der Energiegewinnung könnte jedoch bei beiden Spezies kaum unterschiedlicher sein. Man kann sich das kaum anders erklären, als daß ein 'methanogener' Vorläufer der Halobakterien genetische Information von außen (z.B. Cyanobakterien) erhalten hat. Drei Eigenschaften der Halobakterien lassen sich damit erklären: 1) Fähigkeit zur Atmung (heterotrophes, aerobes Wachstum scheint auch bei Archaeobakterien mehrmals unabhängig voneinander entstanden zu sein, weil es in beiden Hauptzweigen nur bei bestimmten Stämmen - *Sulfolobus* und *Thermoplasma* einerseits und Halobakterien andererseits - anzutreffen ist), 2) Anpassung an veränderte Sauerstoffbedingungen mit Hilfe der Gasvakuolen (beim Vergleich der N-terminalen Sequenzen des Gasvakuolenproteins (94) wurde ca. 60% Homologie festgestellt), 3) Besitz des 2Fe2S Ferredoxins (Halobakterien sind die einzigen Archaeobakterien, deren 2-Oxosäure-Ferredoxin-Oxidoreduktasen ein 2Fe2S Ferredoxin besitzen). Es ist bekannt, daß Halobakterien in salzhaltigen Gewässern in einer Art Symbiose von halotoleranten Cyanobakterien Sauerstoff beziehen. Ein gemeinsames Auf- und Abbewegen durch den Besitz gleicher Gasvakuolenfunktionen würde diese Lebensgemeinschaft sehr erleichtern. Eine zufällige enge Nachbarschaft beider Organismen hat möglicherweise einen Gentransfer, der der Anlaß für die spätere Symbiose war, begünstigt.

Bleibt die Frage nach der Entwicklung des 2-Oxosaure-Ferredoxin-Oxidoreduktase Systems und des 2Fe2S Ferredoxins. Entgegen einer früheren Vorstellung (zuerst Fermentation) geht man heute davon aus, daß die ersten Eubakterien anaerobe phototrophe Organismen waren, aus denen sich nach Abzweigung anaerober fermentativer Bakterien aerob wachsende phototrophe (Cyanobakterien) und organoheterotrophe, atmende Organismen entwickelten. Archaeobakterien gelten als Abzweigungen der 'eukaryontischen' Linie.

Die Evolution des 2-Oxosaure-Ferredoxin-Oxidoreduktase Systems stellt sich folgendermaßen dar: Es ist sicher ein sehr altes Enzymsystem, da es in beiden Gruppen (siehe oben) von phototrophen Anaerobiern (grüne Schwefelbakterien wie *Chlorobium* und Purpurbakterien wie *Chromatium*) vorkommt. Die Coenzyme sind in beiden Fällen 4Fe4S Ferredoxine. Bei Abzweigung der fermentativen Anaerobier (*Clostridium*) blieb das Enzymsystem erhalten. Cyanobakterien behielten das Enzymsystem bei und waren zugleich die ersten Organismen, in deren Photosystem I ein 2Fe2S Ferredoxin als vorletzter Elektronenakzeptor entstanden ist (Photosystem II enthält kein Ferredoxin, während Photosystem I in Cyanobakterien und Chloroplasten grundsätzlich ein membrangebundenes 4Fe4S Ferredoxin und ein lösliches 2Fe2S Ferredoxin enthält). Die oxidative Decarboxylierung bei Cyanobakterien findet nur unter strikt anaeroben Bedingungen (95) in den Heterocysten (Elektronendonator für N_2 -Fixierung) statt. Es ist nicht mit Sicherheit bekannt, ob bei Cyanobakterien der physiologische Elektronenakzeptor der 2-Oxosäure-Ferredoxin-Oxidoreduktase

das 2Fe2S Ferredoxin oder ein 4Fe4S Ferredoxin ist. 4Fe4S Ferredoxine wurden jedoch bisher nie in Cyanobakterien nachgewiesen. Hier mußte demnach der Wechsel vom 4Fe4S Ferredoxin zum 2Fe2S Ferredoxin als Coenzym erfolgt sein. Das 4Fe4S Ferredoxin scheint obligatorisch an anaerobe Bedingungen gebunden zu sein. In Cyanobakterien hat das 2Fe2S Ferredoxin offensichtlich eine Doppelfunktion: Elektronenakzeptor in der Photosynthese unter aeroben Bedingungen und in der oxidativen Decarboxylierung unter anaeroben Bedingungen. Der nächste Schritt war dann seine Funktionsfähigkeit in der 2-Oxosaureoxidation unter aeroben Bedingungen, wie er in Halobakterien verwirklicht ist. Offensichtlich hat bei Cyanobakterien das 2Fe2S Ferredoxin ein 4Fe4S Ferredoxin verdrängt. Nach dieser Verdrängung könnte ein Transfer genetischen Materials auf einen Vorläufer der Halobakterien erfolgt sein. Entweder wurde bei ihm das gesamte archaebakterielle Enzymsystem (Enzym und 4Fe4S Ferredoxin) oder nur das archaebakterielle Coenzym (4Fe4S Ferredoxin) durch diese neuen, cyanobakteriellen Gene verdrängt. Die gleichzeitige Übertragung von 'Atmungs genen', einer sauerstofftoleranten 2-Oxosaure-Ferredoxin-Oxidoreduktase und der genetischen Information für die Anpassung an wechselnde Sauerstoffbedingungen (Gasvakuolen) erscheint sinnvoll. Die anderen Archaebakterien behielten das ursprüngliche Enzymsystem (mit 4Fe4S Ferredoxin) bei. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die oben genannten, 'übertragenen' Gene auf dem Halobakteriengenom benachbart liegen. Sollte dies der Fall sein, würde man sicherlich noch

andere Gene finden, die mitübertragen wurden, und damit das Ausmaß des Gentransfers sehen.

Man könnte die Hypothese wagen, daß das Halobakteriengenom aus zwei Komponenten besteht: einer ursprünglich methanogenen und einer ursprünglich cyanobakteriellen. Vielleicht ist die grundsätzliche Unterteilung des halobakteriellen Genoms in zwei Komponenten, eine mit GC-Gehalt von ca. 58% und eine mit GC-Gehalt von ca. 68% (69) ein Relikt dieses 'doppelten Ursprungs' der Halobakterien.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Reed L.J. (1974) Accounts Chem. Res. 7, 40-46
- (2) Raeburn S. und Rabinowitz J.C. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 146, 9-33
- (3) Uyeda K. und Rabinowitz J.C. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3111-3125
- (4) Gehring U. und Arnon D.J. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6963-6969
- (5) Leach C.K. und Carr N.G. (1971) Biochim. Biophys. Acta 245, 165-174
- (6) Bothe H., Falkenberg B. und Nolteernsting U. (1974) Arch. Microbiol. 96, 291-304
- (7) Kerscher L. und Oesterhelt D. (1977) FEBS Lett. 83, 197-201
- (8) Kerscher L., Nowitzki S. und Oesterhelt D. (1982) Eur. J. Biochem. 128, 223-230
- (9) Kerscher L. und Oesterhelt D. (1981) Eur. J. Biochem. 116, 587-594
- (10) Kerscher L. und Oesterhelt D. (1981) Eur. J. Biochem. 116, 595-600
- (11) Lanyi J. (1974) Bacteriol. Reviews 38(3), 272-290

- (12) Kerscher L. und Oesterhelt D. (1982) Trends Biochem. Sci. 7, 371-374
- (13) Wakabayashi S., Fujimoto N., Wada K., Matsubara H., Kerscher L. und Oesterhelt D. (1983) FEBS Lett. 162(1), 21-24
- (14) Minami Y., Wakabayashi S., Wada K., Matsubara H., Kerscher L. und Oesterhelt D. (1985) J. Biochem. 97, 745-753
- (15) Oesterhelt D. und Stoeckenius W. (1974) Methods Enzymol. 31A, 667-678
- (16) Kerscher L. (1980) Dissertation, Würzburg
- (17) Neuhoﬀ V., Philipp K., Zimmer H. und Mesecke S. (1979) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1657-1670
- (18) Heil A. und Zillig W. (1970) FEBS Lett. 11, 165-168
- (19) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265
- (20) Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L. und Tolbert N.E. (1978) Anal. Biochem. 87, 206
- (21) Benson J.R. (1975) in: Instrumentation in Amino Acid Analysis (Preham, R.N. ed) Academic Press, London
- (22) Laemmli U.K. (1970) Nature 227, 680
- (23) Maurer H.R. (1968) in: Diskelektrophorese. Verlag Walter de Gruyter & Co, Berlin

- (24) Waehneidt T.V. (1971) Anal. Biochem. 43, 306-312
- (25) Edman P. und Henschen A. (1975) in: Protein Sequence Determination (Needleman, S.D. ed) 2nd ed., 232-279, Springer Verlag, Berlin
- (26) Capra J.D., Wilde III C.E. und Klapper D.G. (1977) in: Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis (Previero, A. and Coletti-Previero, M.A. eds), 69-80, North Holland
- (27) Brandt W.F., Edman P., Henschen A. und von Holt C. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 357, 1505-1508
- (28) Lottspeich F. (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 361, 1829-1834
- (29) Gurd F.R.N. (1967) Methods Enzymol. 11, 532-541
- (30) Ballentine R. und Burford D.D. (1957) Methods Enzymol. 3, 1017-1018
- (31) Laskey R.A. (1980) Methods Enzymol. 65, 363-371
- (32) Pharmacia Fine Chemicals 1:1981 Separation News, Application and Practical Notes, 1-3
- (33) Johnstone A. und Thorpe R. (1982) in: Immunochemistry in Practice, 27-31. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- (34) Burnette W.N. (1981) Anal. Bioch. 112, 195-203
- (35) Towbin H., Staehlinger T. und Gordon J. (1979) PNAS USA

76, 4350-4354

- (36) Caruthers M.H. (1982) in: Genetic Engineering 4 (Sellow, J. und Hollaender, A. eds), Plenum Publishing Corp., New York
- (37) Heron E.J. (1984) Am. Biotechnology Lab.. 1-6
- (38) Maniatis T., Fritsch E.F. und Sambrook J. (1982) in: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 230-234, Cold Spring Harbor, New York
- (39) Chirgwin J., Przybyla A., MacDonald R. und Rutter W. (1979) Biochemistry 18(42), 5294-5299
- (40) Chang S.H., Majumdar A., Dunn R., Makabe O., Rajbhandary U.L., Khorana H.G., Ohtsuka E., Tanaka T., Tanijama Y.O. und Ikehara M. (1981) PNAS USA 78(6), 3398-3402
- (41) Vogelsang H., Oertel W. und Oesterhelt D. (1983) Methods Enzymol. 97, 226-241
- (42) Davis R.W., Botstein B. und Roth J.R. (eds, 1980) Advances in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- (43) Oertel W., Kollek E., Beck E. und Goebel W. (1979) Mol. Gen. Genet. 171, 277
- (44) Kahn M., Kolter R., Thomas C., Fingershi D., Meyer R., Remcent E. und Helsinki B.R. (1979) Methods Enzymol. 68, 269

- (45) Maniatis T., Fritsch E.F. und Sambrook J. (1982) in:
Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 98-106. Cold
Spring Harbor, New York
- (46) Maniatis T., Fritsch E.F. und Sambrook J. (1982) in:
Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 150-163. Cold
Spring Harbor, New York
- (47) Southern E.M. (1975) J. Mol. Biol. 98, 503
- (48) Alwine J.C., Kemp D.C., Parker B.A., Reiser J., Renart
J., Stark G.R. und Wahl G.M. (1979) Methods Enzymol.
68, 220-242
- (49) Messing J. und Vieira J. (1982) Gene 19, 269-276
- (50) Sanger F., Niclen S. und Coulson A.R. (1977) PNAS USA
74, 5463-5467
- (51) Biggin M.D., Gibson T.J. und Hong G.F. (1983) PNAS USA
80, 3963-3965
- (52) Garoff H. und Ansorge W. (1982) Anal. Biochem. 114,
450-457
- (53) Mills D.R. und Kramer F.R. (1979) PNAS USA 76,
2232-2235
- (54) Yang R.C.-A., Lis J. und Wu R. (1979) Methods Enzymol.
68, 176-182
- (55) Dayhoff M.O., Barker W.C. und Hunt J.L. (1983) Methods
Enzymol. 91, 524-545

- (56) George B.G., Orcutt B.C., Dayhoff M.O. und Barker W.C.
(1985) PIR Report REL-0185, 1-13, Georgetown University
Medical Center Washington, D.C. 20007 USA
- (57) Orcutt B.C., Dayhoff M.O., George D.G. und Barker W.C.
(1984) PIR Report ALI-1284, 1-14, Georgetown University
Medical Center Washington, D.C. 20007 USA
- (58) Kresze G.-B., Steber L., Oesterhelt D. und Lynen F.
(1977) Eur. J. Biochem. 79, 181-190
- (59) Toeroek J. und Kondorski A. (1981) Nucl. Acids Res. 9,
5711-5723
- (60) Gupta R. (1984) J. Biol. Chem. 259, 9461
- (61) Daniels C.J., Gupta R. und Doolittle W.F. (1985) J.
Biol. Chem. 260, 3132
- (62) Mankin A.S., Teterina N.L., Rubtsov P.M., Baratova L.A.
und Kagramanova V.K. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 6537
- (63) Gupta R., Lanter J.M. und Woese C.R. (1983) Science.
221, 656
- (64) Nazar R.N., Matheson A.T. und Bellemore G. (1978) J.
Biol. Chem. 253, 5646
- (65) Hui J. und Dennis P.P. (1985) J. Biol. Chem. 260, 899
- (66) Daniels C.J., Hofman J.D., MacWilliam J.G., Doolittle
W.F., Woese C.R., Luehrsens U.R. und Fox G.E. (1985)
Mol. Gen. Genet. 198, 270

- (67) Dunn R., McCoy J., Simsek M., Majumdar A., Chang S.H., RajBhandary U.L. und Khorana, H.G. (1961) PNAS USA 78, 6744
- (68) Betlach M., Friedman J., Boyer H.W. und Pfeiffer F. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 7949
- (69) Moore R.L. und McCarthy B.J. (1969) J.Bact. 99, 248-254
- (70) Kagramanova V.K., Mankin A.S., Baratova L.A. und Bogdanov A.A. (1982) FEBS Lett. 144(1), 177-180
- (71) Smeeckens S., van Binsbergen J. und Weisbeck P. (1985) Nucl. Acids Res. 13(9), 3179-3194
- (72) Moura I., Moura J.J.G., Huynh B.-H., Santos H., LeGall J. und Xavier A.V. (1982) Eur.J. Biochem. 126, 95-98
- (73) Hausinger R.P., Moura I., Moura J.J.G., Xavier A.V., Santos M.H., LeGall J. und Howard J.B. (1982) J. Biol. Chem. 257, 14192-14197
- (74) Woese C.R., Stackebrandt E., Macke T.J. und Fos G.E. (1985) System. Appl. Microbiol. 6, 143-151
- (75) Hase T., Ohmiya N., Matsubara H., Mullinger R.N., Roa K.K. und Hall D.O. (1976) Biochem. J. 159, 55-63
- (76) Tanaka M., Nakashima T., Benson A., Mower H. und Yasunobu K.T. (1966) Biochemistry 5, 1666-1681
- (77) Hase T., Wakabayashi S., Matsubara H., Imai T., Matsumoto T. und Tobari J. (1979) FEBS Lett. 103(2),

224-228

- (78) Imai T., Matsumoto T., Ohta S., Ohmori D., Suzuki K., Tanaka J., Tsukioka M. und Tobari J. (1983) *Bioch. Biophys. Acta* 743, 91-97
- (79) Imai T., Saito H., Tobari J., Ohmori D. und Suzuki K. (1984) *FEBS Lett.* 165(2), 227-230
- (80) Nagayama K., Ohmori D., Imai T. und Oshima T. (1983) *FEBS Lett.* 158(2), 208-211
- (81) Howard J.B., Lorschbach T.W., Ghosh D., Melis K. und Stout C.D. (1983) *J. Biol. Chem.* 258(1), 508-512
- (82) Hase T., Matsubara H. und Evans M.C.W. (1977) *J. Biochem.* 81, 1745-1749
- (83) Bruschi M. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91(2), 623-628
- (84) Xavier A.V., Moura J.J. und Moura I. (1981) *Structure and Bonding* 43, 187-213
- (85) Beinert H. und Thomson A.J. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 222(2), 333-361
- (86) Cammack R. (1983) *Chemica Scripta* 21, 87-95
- (87) Kent T.A., Moura I., Moura J.J.G., Lipscomb J.D., Huynh B.H., LeGall J., Xavier A.V. und Münck E. (1982) *FEBS Lett.* 138(1), 55-58
- (88) Tanaka M., Haniu M., Yasunobu K.T., Evans M.C.W. und

- Rao K.K. (1974) *Biochemistry* 13, 2953-2959
- (89) Sato S., Nakazawa K., Hon-Nami K. und Oshima T. (1981) *Bioch. Biophys. Acta* 668, 227-289
- (90) Hille R., Yoshida T., Tarr G.E., Williams C.H., Ludwig M.L., Fee J.A., Kent T.A., Huynh B.H. und Munck E. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 13008-13013
- (91) Johnson M.K., Spiro T.G. und Mortenson L.E. (1982) *J. Biol. Chem.* 257(5), 2447-2452
- (92) George D.G., Hunt L.T., Yeh L.-S. L. und Barker W.C. (1985) *J. Mol. Evol.* 22, 20-31
- (93) Hall D.O., Cammack R. und Rao K.K. (1971) *Nature* 233, 136-138
- (94) Oesterhelt D., Kerscher L., Mathews S. und Lottspeich F. (1984) *Progress in Bioorganic Chemistry and Molecular Biology*, Yu. A. Ovchinnikov ed., 327-334. Elsevier Science Publishers B.V.
- (95) Neuer G. und Bothe H. (1982) *Bioch. Biophys. Acta* 716, 358-365

7. Abkürzungen

Ak	Antikörper
amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Av	<i>Azotobacter vinelandii</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bs	<i>Bacillus subtilis</i>
BAP	bakterielle alkalische Phosphatase
CmC	Carboxymethylcystein
CSO ₃ H	Cysteinsäure
C-	Carboxy-
Cp	<i>Clostridium pasteurianum</i>
Chv	<i>Chromatium vinosum</i>
Chl	<i>Clorobium limicola</i>
cDNA	komplementäre DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dITP	Desoxyinosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
Dg	<i>Desulfovibrio gigas</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FeS	Eisen-Schwefel
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
HPLC	high performance liquid chromatography
HA	Hydroxylapatit
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid
min	Minute
mA	Milliampere
MG	Molekulargewicht
Mb	<i>Methanosarcina barkeri</i>
Ms	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
N-	Amino-
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PTH-	Phenylthiohydantoin-
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RP	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden

Sa	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Ta	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
Tt	<i>Thermus thermophilus</i>
U	units
V	Volt
x-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -galactosid

Lebenslauf

Johannes Maria Griffig

Eltern Martha und Martin Griffig

14. 6. 1954 in Bachhagel geboren

1960 - 1965 Volksschule Gundelfingen

1965 - 1971 Humanistisches Gymnasium Weißenhorn

1971 - 1974 Johann-Michael Sailer Gymnasium Dillingen

1974 Abitur

1974 - 1975 Wehrdienst

1975 - 1980 Studium der Lebensmittelchemie LMU München

1980 1. Staatsexamen

1980 - 1981 Lebensmitteluntersuchungsamt Erlangen

1981 2. Staatsexamen

1981 - 1985 Max-Planck Institut für Biochemie Martinsried

Doktorarbeit unter Anleitung von

Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

